

**Fluoreszierende Vitamin D₃ Analoga – Untersuchungen zu
Aufnahme und Freisetzung in Adipozyten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Claudia Schröder

geboren am 07.03.1977 in Ilmenau

Erster Gutachter: Prof. Dr. G. Jirikowski

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Klinger

Dritter Gutachter: Dr. K. Prüfer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.01.2005

meinen lieben Eltern gewidmet

Verzeichnis der Abkürzungen:

Abb.	:	Abbildung
DBP	:	Vitamin D ₃ -Bindungsprotein
LBD	:	Ligandenbindungsdomäne
PPAR γ	:	peroxisome proliferator activator receptor
PTH	:	Parathyreoidhormon
RXR	:	Retinoid X-Rezeptor
UVB	:	Ultraviolett-B-Strahlung
VDR	:	Vitamin D ₃ -Rezeptor
VDRE	:	Vitamin D ₃ response element

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Vitamin D ₃	3
2.2. Vitamin D ₃ Transport	7
2.3. Vitamin D ₃ Rezeptor	8
2.4. Nichtgenomische Wirkungen	10
2.5. Fluoreszierende Vitamin D ₃ Analoga	11
2.6. Adipozyten	12
2.7. Ziel eigener Untersuchungen	13
3. Material und Methoden	15
3.1. Vitamin D ₃ Analoga	15
3.2. Zellkultur	16
3.3. Transaktivierungsassay	17
3.4. Fettfärbung	18
3.5. Spektrofluorometrie	18
3.6. Mikroskopie	19
3.7. HPLC	20
3.8. Freisetzungsstudien	20
3.9. Statistische Auswertung	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Morphologie des Zellsystems	23
4.2. Speicherung der intakten BODIPY-markierten Vitamin D ₃ Analoga	24
4.3. Aktivitätsnachweis des fluoreszierenden 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	26
4.4. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme der BODIPY-markierten Vitamin D ₃ Analoga in Adipozyten	27
4.5. Akkumulation des BODIPY-Markers in Adipozyten	30
4.6. Spektrofluorometrische Untersuchung der Aufnahme der BODIPY-markierten Vitamin D ₃ Analoga in Adipozyten und Fibroblasten	31
4.7. Abhängigkeit der Aufnahme des BODIPY-Calcitriols in Adipozyten	

von verschiedenen Faktoren	35
4.8. Sättigung der Aufnahme des BODIPY-Calcitriols in Adipozyten	39
4.9. Mikroskopische Untersuchung der Freisetzung von BODIPY-Calcitriol und BODIPY-Calciferol aus Adipozyten	41
4.10. Spektrofluorometrische Untersuchung der Freisetzung von BODIPY- Calcitriol und BODIPY-Calciferol aus Adipozyten	43
4.11. Freisetzung des biologisch aktiven Calcitriols aus Adipozyten	45
4.12. Freisetzung des Calcitriols aus Adipozyten in Abhängigkeit von verschiedenen Substanzen	47
5. Diskussion	49
5.1. Aufnahme von intakten und biologisch aktiven Vitamin D ₃ Analoga	49
5.2. Zeitverlauf und intrazelluläre Verteilung der Vitamin D ₃ Analoga	51
5.3. Aufnahmemechanismus	53
5.4. Einfluss der aus Adipozyten freigesetzten Vitamin D ₃ Analoga auf den Vitamin D ₃ Haushalt	57
5.5. Schlussfolgerungen	60
6. Summary	
7. Literaturverzeichnis	
Danksagung	
Lebenslauf	
Ehrenwörtliche Erklärung	

1. Zusammenfassung

Vitamin D₃ spielt eine zentrale Rolle im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel und ist essentiell für die adäquate Entwicklung und Erhaltung der Knochen. Daneben besitzt es aber eine Reihe weiterer Eigenschaften wie beispielsweise eine antiproliferative und differenzierungsfördernde Wirkung und beeinflusst eine große Anzahl von Organen, zu denen auch das Zentralnervensystem oder das Immunsystem gehören. Vitamin D₃ ist heute als Steroidhormon klassifiziert und wird in der Haut in einer lichtabhängigen Reaktion aus Cholesterol gebildet. Durch die Hydroxylierungen in Leber und Niere entsteht über das Zwischenprodukt 25-Hydroxyvitamin D₃ der biologisch aktive Metabolit 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. Alle Metabolite werden im Blut an DBP gebunden transportiert. Entsprechend der „freien Hormon Hypothese“ wurde bislang angenommen, dass nur der ungebundene Anteil der Hormone aufgrund des lipophilen Charakters in die Zelle diffundieren und durch Bindung an den klassischen intrazellulären VDR biologisch aktiv werden kann. Demzufolge sah man die Funktion des DBP und anderer Carrierproteine lediglich in der Regulation der Bioverfügbarkeit der Vitamin D₃ Metaboliten und der Protektion gegenüber exzessiven freien Mengen des Vitamins. Neuere Studien konnten jedoch eine rezeptorvermittelte Endozytose des 25(OH)D₃/DPB-Komplexes in der Niere nachweisen und stellen somit das System der passiven Diffusion in Frage.

Um den Aufnahmemechanismus sowie den intrazellulären Transport von Vitamin D₃ Metaboliten genauer zu erforschen, wurden fluoreszierende Vitamin D₃ Analoga synthetisiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie, Spektrofluorometrie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie die Modalitäten der Aufnahme, Speicherung und Freisetzung dieser Analoga in der Adipozytenkultur untersucht. Alle untersuchten Vitamin D₃ Analoga wurden in die Fettzellen aufgenommen und vor allem in den Lipidtropfen angereichert, wobei dieser Prozess für die einzelnen Analoga spezifisch war und in Abhängigkeit von Temperatur, Energie und Calciumkonzentration erfolgte. Außerdem zeigte die Aufnahme von BODIPY-Calcitriol eine spezifische Sättigungskinetik und war kompetitiv hemmbar. Fluoreszierende Vitamin D₃ Analoga wurden aus dem Fettgewebe nur sehr langsam freigesetzt, standen aber dann dem Vitamin D₃ Stoffwechsel sofort zur Verfügung. Calcitriol wurde als biologisch aktiver Metabolit in den Adipozyten gespeichert und war nach seiner Freisetzung in der Lage, die Transkription Vitamin D₃ abhängiger Gene zu induzieren. Dabei hatten die Hormone Prolaktin und PTH einen regulierenden Effekt auf die Freisetzung von Calcitriol.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine wichtige Funktion des Fettgewebes in der Aufrechterhaltung des Vitamin D₃ Haushaltes durch die Aufnahme, Speicherung und Freisetzung von Vitamin D₃ Analoga hin. Dabei handelt es sich nicht um einfache, lose regulierte Vorgänge wie beispielsweise die passive Diffusion. Vielmehr deutet die aktive und gezielte Aufnahme der Vitamin D₃ Metaboliten auf einen rezeptor-medierten Aufnahmemechanismus hin, der DBP durch seine Cofunktion bei der Membranrezeptorbindung einen weitaus größeren Stellenwert im Vitamin D₃ Haushalt zuschreibt als bisher angenommen.

2. Einleitung

2.1. Vitamin D₃

Vitamin D ist ein fettlösliches Hormon, das erstmals 1919 von Sir Edward Mellanby aus Lebertran isoliert werden konnte (Mellanby 1919).

Der Körper deckt seinen täglichen Bedarf an Vitamin D durch Aufnahme mit der Nahrung oder durch Bildung der Substanz in einer lichtabhängigen Reaktion in der Haut. Es gibt jedoch nur wenige Nahrungsmittel, die signifikante Mengen an Vitamin D₂ oder Vitamin D₃, die sich lediglich in ihren Seitenketten unterscheiden, enthalten. Zu diesen Nahrungsmitteln zählen beispielsweise Fischöl, Eigelb und Leber. Die Hauptquelle für Vitamin D₃ stellt allerdings die Photosynthese in der Haut dar. Durch den UVB-Anteil (290-315 nm) des Sonnenlichts wird bevorzugt in der Epidermis aus 7-Dehydrocholesterol, einer Vorstufe des Cholesterins, das Provitamin D₃ gebildet (Holick et al. 1977; Okano et al. 1977), welches anschließend zu Vitamin D₃ isomerisiert (Hanewald et al. 1961). Eine Vielzahl von Faktoren wie Hautpigmentation (DeLuca et al. 1984), Sonnencremebenutzung (Matsuoka et al. 1987) oder Hautalter (Reichel et al. 1989) sind jedoch in der Lage diese Produktion herabzusetzen. Da Vitamin D₃ lediglich die Vorstufe des biologisch wirksamen 1,25(OH)₂D₃ ist, sind zwei Hydroxylierungen zur Aktivierung des Hormons notwendig. In einem ersten Schritt wird Vitamin D₃ vornehmlich in der Leber durch eine Cytochrom P450 Monooxygenase am Kohlenstoffatom 25 hydroxyliert. Es gibt einige Kontroversen darüber, ob diese Hydroxylierung lediglich durch das mitochondriale Cytochrom P450 (CYP27) ausgeübt wird (Andersson et al. 1989; Okuda et al. 1995) oder ob auch ein mikrosomales Cytochrom P450 (CYP2C11) eine Rolle in der Aktivierung des Vitamin D₃ spielt (Postlind et al. 1997). Das Produkt der 25-Hydroxylierung, 25-Hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃], ist die hauptsächlich zirkulierende Form des Vitamin D₃ und erreicht Plasmakonzentrationen von 25-125 nM im Menschen. Da die 25-Hydroxylierung nur wenig reguliert ist, steigen die Plasmaspiegel des 25(OH)D₃ proportional zur Vitamin D₃ Bildung bzw. Einnahme. Deshalb gilt die Plasmakonzentration des 25(OH)D₃ im Allgemeinen als Indikator für den Vitamin D₃ Status. In einem zweiten, sehr genau regulierten Schritt, der 1 α -Hydroxylierung des 25(OH)D₃, entsteht die biologisch aktive Substanz 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃]. Diese Hydroxylierung wird ebenfalls durch eine mitochondriale Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP1 α) katalysiert (Ghazarian et al. 1974) und findet fast ausschließlich in der Niere statt (Fraser et al. 1970). Einen Beweis dafür bieten Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz,

die aufgrund fehlender 1α -Hydroxylase und daraus resultierendem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel Rachitis bzw. Osteomalazie entwickeln. Des weiteren wurde gezeigt, dass das menschliche CYP1 α -Gen mit dem chromosomalen Abschnitt der Vitamin D-abhängigen Rachitis (Typ I), einer Krankheit bei der die Patienten unfähig sind $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu produzieren, kolokalisiert (Labuda et al. 1990).

Es gibt einige Hinweise für extrarenale 1α -Hydroxylaseaktivität in Makrophagen (Adams et al. 1985) und Keratinozyten (Bikle et al. 1986). Inwieweit diese Enzymaktivität im Rahmen physiologischer Bedingungen eine Rolle im Vitamin D_3 System spielt, ist derzeit unklar. Bekannt ist jedoch, dass bei bestimmten granulomatösen Erkrankungen (z.B. Sarkoidose) durch das extrarenale Enzym in den Makrophagen erhöhte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Spiegel mit Hyperkalzämie und Hyperkalziurie resultieren (Adams et al. 1994).

Vitamin D_3 Metabolite werden vornehmlich durch Oxidation der Seitenkette inaktiviert und katabolisiert. Das Hauptabbauenzym, die 24-Hydroxylase, gehört ebenfalls zur Gruppe der Cytochrom P450 Monooxygenasen (Knutson et al. 1974) und wurde sowohl in Niere und Knochen (Makin et al. 1989), als auch in anderen Zielgeweben des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nachgewiesen (Tomon et al. 1990, Masuda et al. 1994). Die 24-Hydroxylase katalysiert sowohl die Oxidation des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch des $25(\text{OH})\text{D}_3$, jedoch die erstere Substanz mit einer 10fach höheren Effizienz. Der Abbau beginnt mit einer Oxidation am Kohlenstoffatom 24, gefolgt von weiteren Oxidationen an den Kohlenstoffatomen 24 und 23, die jeweils mit Einbußen an biologischer Aktivität einhergehen, bis schließlich das biologisch inerte Endprodukt Calcitronsäure entsteht (Reddy et al. 1989).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen das 24-Hydroxylasegen fehlt, hohe Serumspiegel an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entwickeln, da die Kapazitäten fehlen, diese Substanz abzubauen (St.-Arnaud et al. 1996). Zusätzliche Abbauwege für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wie beispielsweise die Lactonbildung wurden beschrieben (Ishizuka et al. 1987), spielen jedoch eine untergeordnete Rolle.

Vitamin D_3 spielt eine essentielle Rolle in der Regulierung der Kalziumhomöostase und der Entwicklung und Erhaltung eines gut mineralisierten Skeletts. Vitamin D_3 Defizienz führt dementsprechend zu Rachitis bei Kindern bzw. Osteomalazie bei Erwachsenen.

Die Plasmakalziumspiegel werden konstant um die 1 mmol/l gehalten, was eines strengen Regulationsregimes bedarf. Diese Aufgabe übernehmen im Wesentlichen Vitamin D_3 , PTH und Calcitonin durch Beeinflussung des Dünndarms, der Niere und des Knochens. Im Rahmen einer Hypokalzämie aktiviert der Kalziumrezeptor in den Nebenschilddrüsen die

PTH-Sekretion (Brown et al. 1993), welches die Konzentration des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Blut erhöht indem es in der Niere die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bildung durch Aktivitätssteigerung der 1α -Hydroxylase induziert (Garabedian et al. 1972; Fraser et al. 1973) und den Abbau durch Hemmung der 24-Hydroxylase minimiert (Henry et al. 1981). Hypophosphatämie bewirkt über den gleichen Mechanismus ebenfalls eine Erhöhung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel (Tanaka et al. 1973; Wu et al. 1996). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wiederum stimuliert im Dünndarm den aktiven Transport von Kalzium und Phosphor vom Darmlumen ins Blut (Martin et al. 1969; Chen et al. 1974). Soweit bekannt, ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ das einzige Hormon, das die aktive Aufnahme von Kalzium im Darm fördert. Gemeinsam wirken die Hormone PTH und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf den Knochen und stimulieren die Osteoklastenaktivität. Dadurch wird Kalzium aus dem Skelettsystem mobilisiert (Carlson et al. 1952; Rasmussen et al. 1963). Zusätzlich wirken PTH und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch auf die Niere, wo sie in den Tubuli die aktive Reabsorption des Kalziums stimulieren (Yamamoto et al. 1984). Den Phosphathaushalt betreffend wirken die beiden Hormone jedoch gegensinnig. Während PTH die Phosphatreabsorption in den Tubuli hemmt und somit dessen Ausscheidung erhöht, erhöht $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Phosphatreabsorption in der Niere. Dieser Effekt des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tritt allerdings nur in der Anwesenheit von PTH auf, so dass die Phosphatreabsorption wahrscheinlich weniger auf einer direkten Wirkung des Sterols auf die Niere beruht, als vielmehr auf die Suppression des PTH in den Nebenschilddrüsen zurückzuführen ist. Um den Organismus vor Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie zu schützen, muss das Zusammenspiel dieser Hormone in engen Grenzen reguliert werden. Deshalb beeinflussen PTH und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch das Hauptabbauenzym des Sterols, die 24-Hydroxylase (Tanaka et al. 1975). Die Sekretion von PTH findet nur im Rahmen einer Hypokalzämie und nicht bei adäquaten Kalziumspiegeln statt. Dadurch wird der Abbau des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch die 24-Hydroxylase nur so lange durch das PTH gehemmt wie die Kalziumspiegel im subnormalen Bereich liegen. Zusätzlich aktiviert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch durch Stimulation der Transkription des 24-Hydroxylasegens seinen eigenen Abbau (Tanaka et al. 1974; Zierold et al. 1994). Aber auch die Bildung und Sekretion von PTH werden durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ negativ beeinflusst (Cantley et al. 1985).

In den vergangenen Jahren wurde ein breites Spektrum weiterer Vitamin D_3 Wirkungen entdeckt, die nicht im Zusammenhang mit der Kalziumhomöostase stehen. Dazu gehört beispielsweise seine immunmodulatorische Wirkung. Es ist bekannt, dass Patienten mit Rachitis unter häufigen Infektionen leiden (Stroder et al. 1970), ebenso wie ein abgeschwächter Abwehrmechanismus chronische Niereninsuffizienz begleitet (Asaka et al. 1988). In beiden Fällen kann die Immunitätslage durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Therapie verbessert

werden. Da Vitamin D₃ auch antiproliferative und differenzierungsfördernde Eigenschaften besitzt, wurden verschiedene Vitamin D₃ Analoga als Chemotherapeutika in der Tumorthherapie von Mamma- und Kolonkarzinomen (Saez et al. 1993; Cross et al. 1995) sowie bei Leukämie (Abe et al. 1981) getestet. Allerdings hängt ihr Einsatz sehr von der Entwicklung synthetischer Vitamin D₃ Analoga ab, die selbst in hohen Dosen organspezifisch wirken und keine Hyperkalzämie verursachen. Auch in der Psoriasistherapie kann 1,25(OH)₂D₃ wegen seiner differenzierungsfördernden und antiproliferativen Wirkung auf Keratinozyten eingesetzt werden. Studien haben gezeigt, dass die topische Langzeitanwendung von 1,25(OH)₂D₃ und anderen Analoga sicher ist und bis zu 80% der Patienten eine deutliche Besserung der Symptomatik aufweisen (Holick et al. 1996; Perez et al. 1996). Offensichtlich ist auch der Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ bzw. des VDR auf den Haarzyklus, da Patienten mit Vitamin D-resistenter Rachitis eine Alopezie entwickeln. Es gibt noch eine Reihe weiterer Gewebe, die in unterschiedlichster Weise auf Vitamin D₃ reagieren und zu denen beispielsweise auch Gehirn, Pankreas oder Reproduktionsorgane zählen.

Während Vitamin D₃ den Körper einerseits vor Rachitis und Osteomalazie schützt, können jedoch andererseits zu große Mengen des Hormons zu Intoxikationserscheinungen führen, die mit einer signifikanten Morbidität verbunden sind. Hyperkalzämie assoziiert mit Übelkeit und Erbrechen, Kopfschmerzen, Schwäche und Apathie sowie Gewichtsverlust (Chaplis et al. 1951, Stern und Bell 1989) gehören zu den unspezifischen Kennzeichen einer Vergiftung. Weit schwerwiegender sind die Nephrokalzinose mit Nierenschädigung und die metastatische Kalzifizierung verschiedener anderer Organe (Allen und Shah 1992) einschließlich Arterien und Herz (Toda et al. 1984, Jono et al. 1998). Durch Aufnahme und Speicherung der Vitamin D₃ Metaboliten in verschiedenen Organen und Geweben können Intoxikationserscheinungen bis zu einem gewissen Grad limitiert werden. Neben Leber und Niere, die durch ihren geringen Massenanteil am Körpergewicht nur eine untergeordnete Rolle spielen, speichern vor allem Muskel und Fettgewebe Vitamin D₃. Insbesondere das Fettgewebe kann in kurzer Zeit substantielle Mengen akkumulieren, die denen im Muskel um das Zwanzigfache überlegen sind (Mawer et al. 1972, Lawson et al. 1986). Hauptspeicherform stellt das unveränderte Vitamin D₃ dar. Daneben werden aber auch in geringerer Konzentration polare Metaboliten, zu denen beispielsweise das 25(OH)D₃ gehört, und Esterformen (Rosenstreich et al. 1971) akkumuliert. Da Vitamin D₃ sich sehr schnell im Fettgewebe anreichert, aber nur sehr langsam freigesetzt wird (Brouwer et al. 1998) – die Halbwertszeit beträgt ca. 81 Tage – stellt es einerseits ein Puffersystem zur Begrenzung extremer Vitamin D₃ Plasmaspiegel dar

(van der Klis et al. 1996), wirkt aber andererseits auch als Pool, der den Langzeitvitamin D₃ Status unterstützt und zu Zeiten der Vitamin D₃ Deprivation (z.B. im Winter) Plasmaspiegel des 25(OH)D₃ aufrechterhält.

2.2. Vitamin D₃ Transport

Da Vitamin D₃ und seine Metabolite lipophilen Charakter haben, werden sie im Blut durch Bindung an Plasmaproteine transportiert. Das wichtigste dieser Proteine stellt das Vitamin-D₃-Bindungsprotein dar. Es ist ein Mitglied der Albumin- und Alphafetoprotein-Genfamilie und wird in hohen Konzentrationen in der Leber exprimiert. Daneben finden sich aber auch moderate Konzentrationen in Niere, Fettgewebe und Testis sowie in sehr geringen Konzentrationen in allen anderen Geweben (Cooke et al. 1991). DBP hat die höchste Affinität zu 25(OH)D₃, da aber die Plasmakonzentration von DBP 20fach höher ist als die der Vitamin D₃ Metabolite, sind fast alle zirkulierenden Metabolite an das Plasmaprotein gebunden (Cooke et al. 1989). Wie die Vitamin D₃ Metaboliten in die Zellen gelangen, ist bisher unklar, es wurde jedoch entsprechend der „freien Hormon Hypothese“ bislang angenommen, dass lediglich der ungebundene Anteil der Hormone durch seinen lipophilen Charakter in die Zellen diffundieren und biologisch aktiv werden kann (Bikle et al. 1989, Mendel et al. 1989). Demzufolge sah man die Rolle des DBP und anderer Carrierproteine in der Regulation der Bioverfügbarkeit der Vitamin D₃ Metabolite (Haddad 1995) und der Protektion gegenüber exzessiven freien Mengen des Vitamins (Bouillon 1981). Ein solches Modell verlangt jedoch eine unspezifische Aufnahme des Hormons in alle Zellen, um mit dem intrazellulären VDR interagieren zu können. Im Gegensatz dazu würde ein rezeptorgebundener Aufnahmemechanismus eine zellspezifische Adressierung sicherstellen. Studien mit Megalin knock-out Mäusen haben einen solchen Aufnahmemechanismus in der Niere identifiziert (Nykjaer et al. 1999). Der Megalinrezeptor ist ein 600 kDa Transmembranprotein der proximalen Tubuluszellen und ist ein Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie (Saito et al. 1994). DBP-gebundene Vitamin D Metabolite werden in der Niere glomerulär filtriert und anschließend rezeptorvermittelt endozytiert. Neben dem Megalinrezeptor spielt hierbei auch Cubilin eine entscheidende Rolle (Nykjaer 2001). Während in den Lysosomen der Zelle die Carrier degradiert werden, steht 25(OH)D₃ zur weiteren Hydroxylierung bereit. Das freigesetzte 25(OH)D₃ und andere Vitamin D₃ Metabolite diffundieren jedoch auch

intrazellulär nicht zufällig an ihren Wirkort, sondern werden wie neuere Studien zeigen durch Shuttleproteine zum VDR und Cytochrom P450 transportiert (Wu et al. 2000). Diese als intrazelluläre Vitamin D Bindungsproteine (IDBP) bezeichneten Carrier, gehören zu der Familie der Hitzeschockproteine 70. Da IDBPs in der Lage sind, die Transkription von Vitamin D₃ regulierten Genen zu erhöhen, und mit Megalin und Hydroxylasen interagieren, scheinen diese Proteine eine zentrale Rolle im intrazellulären Transportmechanismus der Vitamin D₃ Metaboliten einzunehmen.

2.3. Vitamin D₃ Rezeptor

Die meisten Wirkungen des 1,25(OH)₂D₃ werden durch einen nukleären Rezeptor (Evans et al. 1988) vermittelt, den Vitamin D₃ Rezeptor. Durch Bindung des Liganden wird der VDR induziert, Heterodimere mit dem Retinoid-X Rezeptor zu bilden, die unter Einbeziehung weiterer Aktivierungsfaktoren an Vitamin D₃ response elements binden und die Gentranskription aktivieren. Innerhalb der Gruppe der nukleären Rezeptoren weist der VDR die größten Ähnlichkeiten mit dem Thyreoidhormonrezeptor, dem Retinoidsäurerezeptor und dem peroxisome proliferator activator receptor auf. Der VDR von verschiedenen Spezies wurde geklont (Baker et al. 1988; Burmester et al. 1988; Elaroussi et al. 1994; Kamei et al. 1995) und zeigt große Übereinstimmungen in Größe und Sequenz des Proteins. So besteht der VDR der Ratte beispielsweise aus 423 Aminosäuren, während das menschliche Protein zusätzliche 4 Aminosäuren am NH₂-Ende besitzt. Wie andere nukleäre Rezeptoren auch, kann der VDR in verschiedene Domänen unterteilt werden (Glenville et al. 1998). Wie in Abb. 1 zu sehen, befindet sich am NH₂-Ende die A/B-Region, die ungefähr 20 Aminosäuren umfasst und der im VDR bisher keine Funktion zugeschrieben wurde. Der nachfolgende Abschnitt der Aminosäuren 20 – 90 ist die DNA-Bindungsdomäne (DBD) oder auch C-Region genannt.

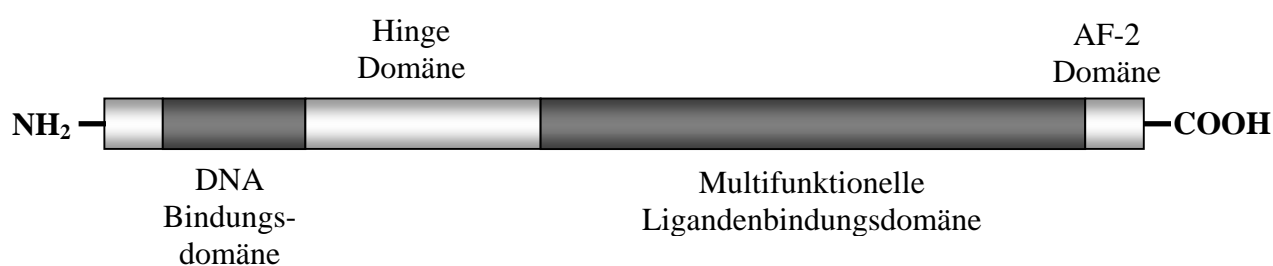


Abb. 1: Übersicht über die Domänen des Vitamin D₃ Rezeptors

Die Abschnitte DE umfassen sowohl die Hinge-Domäne (Aminosäuren 90 – 130) als auch die COOH-terminale Ligandenbindungsdomäne mit der AF-2 Region (Aminosäuren 130 – 423). Die LBD bindet $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit hoher Affinität ($K_d = 10^{-10}$ bis 10^{-11} M) (Ross et al. 1991). Sowohl die 1α - als auch die 25-Hydroxylgruppe des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind wichtig für diese Bindung und der Verlust einer dieser beiden Hydroxylgruppen resultiert in einer 500fachen Abnahme der Affinität des Liganden zum Rezeptor (DeLuca et al. 1976). Nach Bindung des Liganden transloziert der vorwiegend zytoplasmatische VDR entlang von Mikrotubuli in den Nukleus (Kamimura et al. 1995). Die Bindung des Liganden allein ist jedoch nicht ausreichend für eine suffiziente Bindung des VDR an die DNA. Erst die Heterodimerisierung mit RXR führt zur Bindung an VDRE und zur Induktion der Gentranskription (Kliwer et al. 1992). VDRE sind spezifische DNA-Abschnitte mit einer Wiederholung einer bestimmten Hexamersequenz (AGGTCA), die durch einen Spacer von 3 Nukleotiden (DR3-Typ) getrennt sind. Diese Sequenz dirigiert die VDR-RXR Heterodimere zur Promotorregion der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Gene (Haussler et al. 1998). Die Interaktion des VDR mit der DNA findet über die DNA-Bindungsdomäne des VDR statt, die aus zwei Fingerstrukturen besteht. Diese sind jeweils um ein Zinkatom tetraedrisch über Sulfhydrylbindungen von vier Cysteinresten angeordnet (Ozono et al. 1991). Eine solche Struktur ist eine Anpassung an die Helixstruktur der DNA (Towers et al. 1993). Die meisten der natürlichen Mutationen, die im menschlichen VDR vorkommen, befinden sich in dieser Zinkfingerregionen und resultieren in einer defekten DNA-Bindung und schweren Formen der Vitamin D Resistenz (Haussler et al. 1998). Für die transkriptionelle Aktivität des VDR ist aber ebenso die Bindung von Coaktivatoren und transkriptionellen Cofaktoren essentiell (Danielian et al. 1992; Tate et al. 1996). Ein Teil dieser Coaktivatoren bindet in der AF-2 Region, einer liganden-abhängigen Transaktivierungsdomäne, die nach Bindung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Konformationsänderung erfährt. Zu der ständig wachsenden Liste dieser Faktoren gehören beispielsweise der steroid receptor coactivator SRC-1 (Onate et al. 1995), der 62 kDa nuclear coactivator NcoA-62 (Baudino et al. 1998) oder der generelle Transkriptionsfaktor TFIIB (Blanco et al. 1995). SRC-1 wiederum kann zusätzlich auch mit anderen „Integratoren“ aus der Familie der CBP/p300 Cofaktoren reagieren (Smith et al. 1996). Beide Substanzen besitzen Histonazetyltransferaseaktivität (Glass et al. 1997, Kouzarides et al. 1997), so dass die Rekrutierung von Coaktivatoren in einer Umgestaltung der DNA-Struktur durch Azetylierung von Histonen und der daraus folgenden Freisetzung von der DNA resultiert. Das hat zur Folge, dass der Promotor für die „Transkriptionsmaschinerie“ zugänglich wird und damit die Transkription der entsprechenden Vitamin D_3 regulierten Gene steigt. Zu diesen Proteinen

gehören Osteocalcin (Demay et al. 1990), Osteopontin (Noda et al. 1990), Calbindine (Christakos et al. 1992), die CYP24-Hydroxylase (Zierold et al. 1995), Histone H4, Proteinkinase, Transglutaminase und andere (Reichrath et al. 1993). Im Gegensatz zu den Genen, deren Transkriptionsrate durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesteigert wird, gibt es auch Gene, zu denen PTH (Demay et al. 1992), IL-2 (Alroy et al. 1994) oder CYP1 α -Hydroxylase (Shinki et al. 1998) gehören, die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ runterreguliert werden. Allerdings ist der genaue Mechanismus dieser Transkriptionsinhibition noch unbekannt.

2.4. Nichtgenomische Wirkungen

Der durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bindung aktivierte nukleäre VDR entfaltet seine Wirkung durch Stimulation der Gentranskription und Proteinsynthese. Diese zellulären Effekte benötigen jedoch Zeit und können erst nach einigen Stunden beobachtet werden. Daneben gibt es aber auch nichtgenomische Effekte des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die zu schnell verlaufen, als dass sie auf die Aktivierung der Gentranskription durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zurückgeführt werden könnten. Zu diesen Effekten, die innerhalb von Minuten messbar werden, gehören beispielsweise Änderungen im Phosphoinositidmetabolismus (Bourdeau et al. 1990; Morelli et al. 1993), Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (Lieberherr et al. 1987; Sugimoto et al. 1988), Stimulation des intestinalen Kalziumtransportes (Nemere et al. 1984) und Aktivierung der Proteinkinase C (Sylvia et al. 1996). Sie werden wahrscheinlich durch einen Rezeptor vermittelt, der sich vom nukleären VDR unterscheidet und von dem vermutet wird, dass es sich um einen Membranrezeptor handelt. Diese Hypothese unterstützen Untersuchungen bei VDR knock-out Mäusen, die weiterhin in Osteoblasten diese schnellen zellulären Reaktionen aufweisen (Li et al. 1998). Außerdem zeigen Experimente von Boyan und Schwartz, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Analoga, die den nukleären VDR mit einer 1000fach geringeren Affinität binden als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die Proteinkinase C mit der gleichen Potenz aktivieren wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst (Boyan et al. 1997). In der duodenalen Plasmamembran des Huhns konnte ein 66-kDa Protein isoliert werden, welches spezifisch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bindet (Nemere et al. 1994). Das gleiche Protein wurde in Chondrozyten der Ratte nachgewiesen (Nemere et al. 1998). Durch Blockade dieses Membranproteins wird die schnelle Stimulation der Proteinkinase C durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gehemmt. Zahlreiche Studien lassen jedoch die Existenz weiterer Membranrezeptoren vermuten (Baran et al. 1998). Neben Chondrozyten und

Dünndarmepithel besitzen auch Adipozyten Membranrezeptoren, die durch Änderung der PKC und des intrazellulären Kalziumspiegels die insulinvermittelte Glucoseaufnahme (Huang et al. 2002) und den Fettstoffwechsel der Zellen (Shi et al. 2001) verändern. Die Rolle der nichtgenomischen Effekte ist in den meisten Zellen bislang ungeklärt. Es ist jedoch denkbar, dass der Membranrezeptor durch Aktivierung der PKC Einfluss auf die Phosphorylierung des VDR und damit den Aktivitätszustand desselben nimmt.

2.5. Fluoreszierende Vitamin D₃ Analoga

Zum besseren Verständnis der Steroidrezeptoraktivierung und der intrazellulären Lokalisation von Hormon und Rezeptor wurden eine Vielzahl von fluoreszierenden Hormonanaloga hergestellt. Die bis dahin durchgeführten Studien mit radioaktiven Liganden hatten ihre Limitationen und speziell ein Echtzeitmonitoring war nicht möglich. Aber auch die Synthese von fluoreszierenden Hormonanaloga war nicht ohne Probleme, so traten vor allem der Verlust der hochspezifischen Rezeptorbindung (Oxenhandler et al. 1984, Miksicek 1993), der biologischen Aktivität (Pons et al. 1985, Shimizu 1991) oder die Hydrolyse der Esterbindung von Hormon und fluoreszierendem Marker (Kute et al. 1983) auf.

Barsony et al. (1995) entwickelten grün fluoreszierende Vitamin D Analoga, die diesen Ansprüchen gerecht wurden. Der fluoreszierende Marker BODIPY wurde in der 3 β -Position des A-Ringes durch eine Esterbindung mit Calcitriol verbunden. Diese Esterbindung war nicht anfällig für Hydrolysen durch endogene Esterasen, sondern die fluoreszierenden Hormone wurden in polarere Analoga metabolisiert, ohne jedoch den BODIPY-Marker zu verlieren. Und auch die biologische Aktivität und die Affinität des BODIPY-Calcitriols waren suffizient vorhanden. Mit dieser Methode ist es möglich Hormonaufnahme und Freisetzung sowie die zytoplasmatische und nukleäre VDR Lokalisation darzustellen (Barsony et al. 1996).

2.6. Adipozyten

Fettgewebe ist eine spezielle Art von Bindegewebe, das sich überwiegend aus Adipozyten zusammensetzt. Adipozyten entwickeln sich ebenso wie Chondrozyten, Osteoblasten oder Myozyten aus pluripotenten Stammzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind (Cornelius et al. 1994). Die Hauptfunktion des Fettgewebes, das bei normalgewichtigen Männern 15-20 % und bei normalgewichtigen Frauen 20-25 % des Körpergewichts ausmacht, ist die Speicherung von Triacylglycerinen in Zeiten des Energieüberschusses und die Mobilisierung dieser Energie in Zeiten des Nahrungsmangels. Daneben können aber auch lipophile Substanzen wie verschiedene Vitamine, Medikamente oder Toxine in den Adipozyten gespeichert werden. Die lipogenen und lipolytischen Prozesse werden vor allem neural und hormonell reguliert. Langfristige Änderungen im Bedarf der Fettspeicherung werden vor allem durch Zunahme der Größe und Anzahl der Adipozyten realisiert. Da jedoch differenzierte Fettzellen nicht mehr zur Mitose befähigt sind, entwickeln sich neue Fettzellen aus Präadipozyten.

Die Entwicklung und Differenzierung von Adipozyten wurde vornehmlich an in vitro Modellen erforscht, da primäre Zellkulturen entscheidende Nachteile aufweisen. Zelllinien von Adipozytenvorläufern können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet die pluripotenten Fibroblasten, zu denen beispielsweise die 10T1/2 Zelllinie gehört (Reznikoff et al. 1973) und die sich in Abhängigkeit von exogenen Einflüssen in verschiedene Zelltypen differenzieren können, und unipotente Präadipozyten, zu denen die 3T3-L1 (Green et al. 1974) oder die Ob1771 Zelllinien (Negrel et al. 1987) gehören. Die letztgenannten können sich lediglich zu Adipozyten differenzieren oder im Stadium der Präadipozyten verbleiben.

Das am besten charakterisierte und verlässlichste Modell ist das der 3T3-L1 Präadipozyten. Sie besitzen nicht nur die ultrastrukturellen Eigenschaften von Adipozyten in vivo (Novikoff et al. 1980) und eine vergleichbare Formation der Fetttropfen (Green et al. 1974), sondern sie differenzieren auch in Mäusen, die mit 3T3-L1 Zellen injiziert wurden, zu normalen Fettgewebe, das sich nicht von dem endogenen unterscheidet (Green et al. 1979). Die konfluenten 3T3-L1 Präadipozyten differenzieren optimal mit Hilfe von Insulin, Glukokortikoiden, Isobuthylmethylxanthine und Kälberserum (Student et al. 1980). Die differenzierenden Zellen durchlaufen einen postkonfluenten Mitosezyklus und verbleiben dann im Stadium des Wachstumsstillstands (Bernlohr et al. 1985). Dieser Mitosezyklus ist wahrscheinlich notwendig, um die Gene, die verantwortlich für die Differenzierung der Zellen

zu ausgereiften Adipozyten sind, für Transkriptionsfaktoren zugänglich zu machen. Zu den ersten Genen, die in dieser Phase exprimiert werden und die deshalb auch als frühe Marker bezeichnet werden, gehören die promitotischen Gene c-jun, c-fos und c-myc (Cornelius et al. 1994). Es schließt sich die Expression von CCAAT/enhancer binding proteins - C/EBP β und C/EBP δ - an (Lane et al. 1999), die die Expression des C/EBP α und des peroxisome proliferator-activated receptor γ vermitteln (Clarke et al. 1997). Die beiden letztgenannten Faktoren initiieren schließlich das Differenzierungsprogramm der Zellen (Lin et al.). Im Gegensatz zu den bis dahin lediglich transient exprimierten Proteinen, werden nun Gene der sogenannten späten Marker der Differenzierung transkribiert, die Proteine und Enzyme kodieren, die den Phänotyp der Adipozyten kreieren und aufrechterhalten (Gregoire et al. 1998). Die Zellen runden sich ab, akkumulieren Fetttropfen und werden zu terminal differenzierten Adipozyten.

2.7. Ziel eigener Untersuchungen

Die Speicherung von Vitamin D₃ und seinen Metaboliten ist ein wenig beforschtes Gebiet. Bisherige Studien wurden zum größten Teil mit radioaktiv markierten Vitamin D₃ Analoga oder in nativer Form im Tiermodell durchgeführt. Aufgrund der erstmaligen Anwendung von fluoreszierenden Analoga in vitro ist jedoch neben Aussagen zur Aufnahme und Speicherung, auch eine Beurteilung des intrazellulären Trafficking möglich.

Durch Arbeiten von Mawer et al. (1972) und Rosenstreich et al. (1971) ist zwar bekannt, dass Vitamin D₃ und 25(OH)D₃ sowohl im Tiermodell als auch bei Menschen im Fettgewebe akkumuliert werden, jedoch wird keinerlei Aussage über den biologisch aktiven Metaboliten 1,25(OH)₂D₃ getroffen. Neuere Studien geben Grund zur Annahme, dass 1,25(OH)₂D₃ (Rungby et al. 1990, Rungby et al. 1993) ebenfalls in Adipozyten angereichert wird. Da jedoch die Bildung des 1,25(OH)₂D₃ im Fettgewebe nicht absolut ausgeschlossen werden konnte, erscheint es von großem Interesse die Aufnahme und Speicherung dieses aktiven Metaboliten in einer Studie erneut zu untersuchen. Unklar bleibt auch, wie die langsame Rückverteilung des Hormons aus den Fettspeichern ins Plasma reguliert ist. Da die gespeicherten Metaboliten des Vitamin D₃ noch nach Monaten signifikante Konzentrationen im Fettgewebe erreichen und zu erhöhten Plasmaspiegeln sowie zu Intoxikationserscheinungen beitragen können (Shetty et al. 1975, Allen und Shah 1992), ist es

empfehlenswert zu untersuchen, ob die Freisetzung der Hormone und insbesondere des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unter bestimmten Umständen forciert werden kann und welche Rolle das Fettgewebe im straff regulierten Regime des endokrinen Systems des Vitamin D_3 spielt. Nicht zuletzt stellt sich natürlich auch die Frage nach den Aufnahmemechanismen der Vitamin D_3 Analoga und den Gründen für die spezielle Anreicherung im Muskel- und Fettgewebe (Mawer et al. 1972). Experimente mit Megalin knock-out Mäusen haben gezeigt, dass es in der Niere einen membranständigen Rezeptor gibt, der an DBP-gebundenes $25(\text{OH})\text{D}_3$ in den Tubuli rückresorbiert (Nykjaer et al. 1999). Da ein Teil der Vitamin D_3 Metabolite auch an Lipoproteine gebunden transportiert wird und es große Ähnlichkeiten zwischen Megalin- und LDL- rezeptorvermittelter Endozytose gibt, soll auch die Aufnahme der Vitamin D_3 Metaboliten genauer betrachtet werden.

Die Untersuchung der Modalitäten der Aufnahme, Speicherung und Freisetzung sowie das Echtzeitmonitoring des intrazellulären Transportes von fluoreszierenden Vitamin D_3 Analoga in der Adipozytenzellkultur ist das Ziel dieser Arbeit.

3. Material und Methoden

3.1. Vitamin D₃ Analoga

Es wurden folgende Vitamin D₃ Analoga in die Studie einbezogen: 1.25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol), 25-Hydroxyvitamin D₃ (Calcidiol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol). Calcitriol wurde von Duphar B.V. aus den Niederlanden und 25-Hydroxyvitamin D₃ sowie Vitamin D₃ wurden von Sigma bezogen. Mit freundlicher Unterstützung von Vinc Poszgay wurden diese Hormone an der mit „R“ gekennzeichneten Position C₃ durch eine Esterbindung mit BODIPY®581/591, wie schon von Barsony für das grün fluoreszierende BODIPY-Analog beschrieben (Barsony et al. 1995), verbunden. Bei BODIPY®581/591 handelt es sich um 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid, einen rot fluoreszierenden Marker (Extinktion: 581nm, Emission: 591nm) von Molecular Probes. Die Hormone wurden trocken bei -20°C in Dunkelheit aufbewahrt und lagen für die Experimente in ethanolischer Lösung vor.

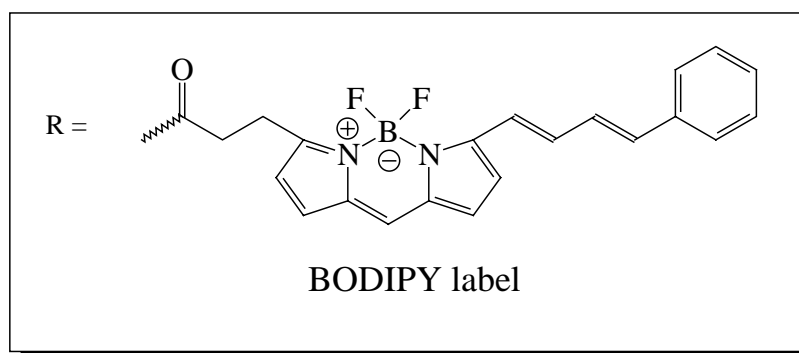
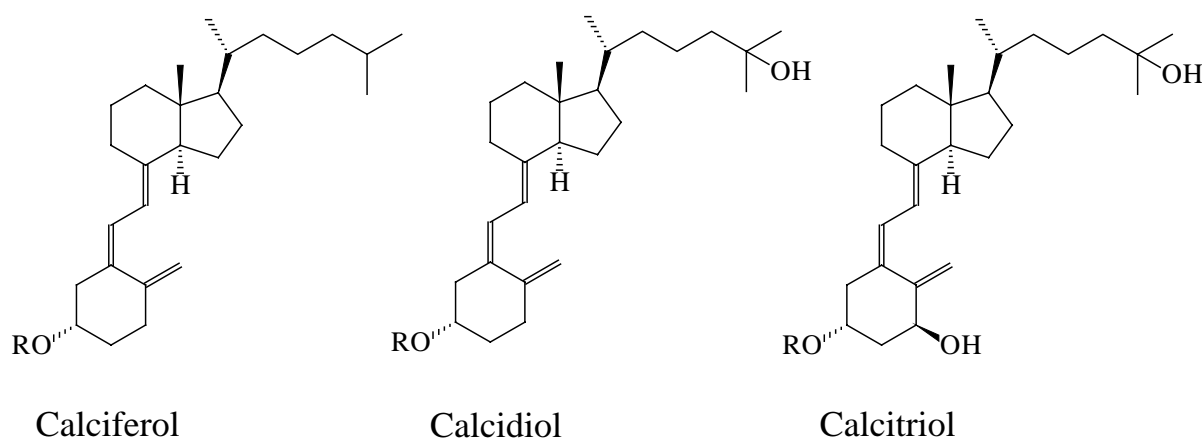


Abb. 2: Strukturformeln der verwendeten Vitamin D₃ Analoga

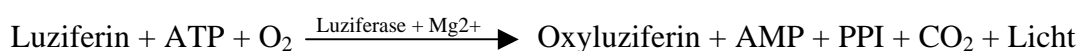
3.2. Zellkultur

Fibroblasten von Mäuseembryonen, auch 3T3-L1 Zellen bezeichnet, wurden von American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Diese Zellen entwickeln sich über Präadipozyten zu adipozytenähnlichen Zellen, sobald sie vom rapiden Teilungsstadium in das konfluente kontaktinhibierte Stadium übertreten. Durch spezielle Nährmedien kann dieser Prozess verkürzt und intensiviert werden. Die Fibroblasten wurden bei 37°C und Luftatmosphäre mit 5% CO₂ in Medium I mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) von ATCC, das 4mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose und 1,5 g/l Natriumcarbonat enthält und mit 10% fötalem Kälberserum (HyClone) und 0,1 mg/ml Gentamycin (Life Technology) supplementiert wurde, kultiviert. Die Zellen wurden jeweils geteilt bevor sie Konfluenz erreichten und in neuen 162 cm² Kulturflaschen von Costar subkultiviert. Zum Teilen wurde das Medium aus den Flaschen entfernt und diese einmal mit 5 ml Trypsin (Invitrogen) gewaschen bevor sie für ca. 2 min mit 5 ml Trypsin inkubiert wurden bis sich die Zellen von der Oberfläche lösten. Um den Differenzierungsprozess anzuregen, wurden Präadipozyten 48 Stunden nachdem sie konfluent waren, mit einem speziellen Medium II für 2 Tage weiterbehandelt. Dieses Medium basierte ebenfalls auf DMEM (Biofluids) und beinhaltete außerdem folgende Zusatzstoffe: 10% fötales Kälberserum, 2mM Glutamin (Life Technology), 0,1 µM Insulin (Eli Lilly), 0,1 mg/ml Gentamycin, 0,5 mM Isobutylmethylxanthin (Sigma) und 1 µM Dexamethason (Sigma). Danach wurden die nun auch schon vereinzelt Fettvakuolen aufweisenden Zellen für weitere 2 Tage in Medium III mit DMEM, komplementiert mit 10% fötalem Kälberserum, 2mM Glutamin, 0,1 mg/ml Gentamycin und 1 µg/ml Insulin, kultiviert. Die differenzierten Adipozyten wurden in Medium IV, welches jeden 2. Tag in den Zellkulturen ausgetauscht wurde, bis zum Beginn der jeweiligen Experimente weiterkultiviert. Medium IV enthielt DMEM, 10% fötales Kälberserum, 2mM Glutamin und 0,1 mg/ml Gentamycin. Die Adipozyten wurden in 162 cm² Kulturflaschen differenziert und für die Mikroskopie in gekammerten Glasobjektträgern (Nalge Nunc Int.) oder für die Spektrofluorometrie in 6-Lochplatten (Costar) subkultiviert. Die Zellen durften während der Differenzierungsphase nicht geteilt werden.

Für den Transaktivierungsassay wurden CV-1 Zellen (ATCC), Fibroblasten von afrikanischen Affen (*Cercopithecus aethiops*), verwendet. Diese Zellkultur wurde in DMEM komplementiert mit 10% fötalem Kälberserum, 2mM L-Glutamin, 0,1 µM Insulin und 0,1 mg/ml Gentamycin kultiviert und ebenfalls wie oben beschrieben mit Trypsin geteilt.

3.3. Transaktivierungsassay

Der Transaktivierungsassay kann als ein Verfahren beschrieben werden, bei dem durch eine Lichtreaktion indirekt das Ausmaß der Genaktivierung bestimmt werden kann. Das Licht wird durch eine ATP-abhängige Reaktion produziert, bei der die chemische Energie der Luziferinoxidation durch Elektronenübertragung frei wird. Dieser Prozess wird durch die Luziferase, ein 61 kDa großes Enzym, welches auch Glühwürmchen besitzen, katalysiert. Als Produkt entsteht Oxyluziferin. Das entstandene Licht, dessen Intensität für annähernd eine Minute konstant bleibt, wird quantitativ durch ein Luminometer erfasst (Wood et al. 1991; Seliger et al. 1960).



CV-1 Zellen wurden in 12-Lochplatten (Costar) mit antibiotikafreiem Medium subkultiviert und nach 24 Stunden mit dem Reporterplasmid p24OH/Luc-23 (ein Geschenk von H.F. DeLuca, University of Wisconsin, Madison, WI) unter Benutzung von LipofectAMINE Plus Reagenzien (Invitrogen) transfiziert. Das p24OH/Luc-23 Plasmid verschlüsselt ein Luziferasegen, welches unter der Kontrolle des 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase Promotors steht (Kimmel-Jehan et al. 1997). Dadurch wird proportional zur Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an das VDRE das Luziferasegen transkribiert.

Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu 70-80% konfluent sein. Zu Beginn der Transfektion wurden Lösungen A und B hergestellt: Lösung A enthielt 375 µl des serumfreien Basalmediums (500 ml DMEM und 10 ml L-Glutamin), 0,07 µg DNA des Luziferasegenz sowie Plus-Reagent pro Loch, in Lösung B wurden 12 µl Lipofectamine Reagenz in 375 µl serumfreies Basalmedium pro Loch gegeben. Diese zwei Lösungen wurden dann gemischt und bei Raumtemperatur für 15-20 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit serumfreiem Medium einmal gewaschen und 750 µl des Lösungsgemisches in jedes Loch gefüllt, so dass die Zellschicht bedeckt war. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂, wurden die Löcher auf jeweils 2 ml mit normalem Nährmedium (500 ml DMEM, 50 ml fötales Kälberserum, 10 ml L-Glutamin, 4 IE Insulin und 5 ml Gentamycin) aufgefüllt. Am nächsten Tag wurden die Hormone in verschiedenen Konzentration bzw. Ethanol als Kontrolle in folgendem Medium den Zellen zugegeben und für 48 Stunden inkubiert: 500 ml MEM (Biofluids), 5 ml IST (Biofluids), 5 ml L-Glutamin und 2,5 ml Gentamycin. Nach der Inkubationszeit wurden Zelllysate angefertigt. Dazu wurde Lysierpuffer (1X) aus einem 5X Vorrat von Promega zubereitet und auf Eis gestellt. Das alte Medium wurde von den Zellplatten entfernt und diese anschließend mit kaltem DPBS (2,5 ml

pro Loch) zweimal gewaschen. Pro Loch wurden 400 µl des Puffers benötigt, der nun den Platten zugegeben wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Schaber von den Platten abgekratzt, das gesamte Volumen in Röhrchen umgefüllt und bei -80°C tiefgefroren. Das Tieffrieren sollte vor den Messungen zusätzlich zum Lysierpuffer eingesetzt werden, damit die Zellstrukturen vollständig zerstört werden und sich so bessere Ergebnisse erzielen lassen. Nach dem Auftauen der Proben und des Luziferasesubstrats von Promega, wurden die Proben gut geschüttelt und anschließend 20 µl in Borosilikatröhrchen für die Luziferasemessung gefüllt. Die Messung erfolgte am Luminometer Monolight 2010 von Analytical Luminescence Laboratory (San Diego, CA) und alle Proben wurden als Duplikate gemessen.

3.4. Fettfärbung

Zur Bestätigung der Differenzierung der Fibroblasten in Adipozyten wurde eine Fettfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in gekammerten Glasobjektträgern subkultiviert und für 10 min in 4%er Formaldehydlösung bei pH 7,4 fixiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit Leitungswasser. Die Fettvakuolen wurden für 10 min mit einer gesättigten Sudan-III-Lösung gefärbt, die aus Sudan-III-Pulver von Sigma und Isopropanol hergestellt und gefiltert wurde. Nach zwei weiteren Waschschrten wurden die Zellen in einer 1:5 Verdünnung mit destillierten Wasser, die 0,05% Azur II, 0,02% Methylenblau und 0,05% Natriumborat enthält, gegengefärbt. Die Objektträger wurden nicht eingedeckt, sondern die Zellen wurden nach dem letzten Waschen in DPBS aufbewahrt und anschließend gleich mikroskopiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 10 Mikroskop unter Zuhilfenahme der Software „Esee and Isee“ von Inovision Corporation aufgenommen.

3.5. Spektrofluorometrie

Spektra und Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Spektrofluorometer von Photon Technology International Inc. (PTI, ALPHA-SCAN) mit einem R928P Photomultiplier von Hamamatsu aufgenommen. Der Exzitationsmonochromator und die Emissionsbandweite waren 1,5 nm. Die Exzitation wurde auf 543 nm und Emission auf 588 nm eingestellt. Die

Integrationszeit betrug 1 Sekunde. Die Daten werden als Anschläge pro Minute ausgedrückt. Die Zellen wurden in 6-Lochplatten subkultiviert und mit BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga oder Vehikel (wasserfreies Ethanol) inkubiert. Das Medium, welches die Hormone oder das Vehikel enthielt, wurde jeden 2. Tag erneuert. Für die Messung wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Methanol auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden mit einem Schaber von den Platten abgekratzt und in Eppendorfröhrchen transferiert. Die fluoreszierenden Hormone wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur und in Dunkelheit bei intensivem Schütteln alle 15 min extrahiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand über dem Zelldebris wurde gemessen. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen wurden durch die Zellzahl pro Loch normalisiert. Für die Zellzählung wurde ein Coulter Z2 Zellzähler entsprechend der dem Zähler beiliegenden Nutzungsanweisungen benutzt.

3.6. Mikroskopie

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen 24 Stunden vor der Hormonbehandlung in gekammerten Glasobjektträgern subkultiviert. Die BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga wurden zusammen mit frischem Medium den Zellen in einer Konzentration von 10^{-7} M bzw. 10^{-8} M zugefügt und für verschieden lange Intervalle inkubiert. Die DNA der Zellen wurde für 15 min mit dem Hoechst-Farbstoff 33342 (1 µg/µl) von Molecular Probes gefärbt. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen innerhalb von 2 Stunden mikroskopiert.

Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop gemacht, welches mit einer LSM 410 Laser-Scanning Einheit (Carl Zeiss INC.) ausgestattet ist und ein 100X 1.4 Objektiv benutzt. Der 568 nm Kanal eines Krypton-Argon-Lasers mit einem 590 nm Langpassemissionsfilter wurde für die Detektion der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga und der 364 nm Kanal eines UV-Lasers mit einem 397 nm Langpassemissionsfilter für die Detektion der gefärbten DNA verwendet.

3.7. HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)

Die BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga wurden mit einem HPLC-System von Hewlett Packard Series 1100, das mit einer Eclipse XDB-C18 Säule ausgestattet war, separiert. 100 µl der Probe wurden geladen und mit dem Solvenz 100% Azetonitril bei 1ml/min laufen gelassen. Die Absorption wurde mit einem Diodenanordnungsdetektor bei 254 nm für die Vitamin D₃ Analoga und bei 584 nm für BODIPY gemessen. Zur Extraktion der rot fluoreszierenden Hormone, wurden die Zellen in 162 cm² Kulturflaschen für 3 Tage mit 100 nM der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga inkubiert. Nach drei Waschschritten mit DPBS wurden die Zellen mit einem Schaber in PBS abgekratzt und in Eppendorfröhrchen transferiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und die Überstände abpipettiert. Den Sedimenten wurden 250 µl deionisiertes Wasser hinzugefügt und dann extensiv geschüttelt. Die Zerstörung der Zellstrukturen mittels Ultraschall (Sonication) erfolgte mit einem Sonicator (XL 2020) von Misonix. Die Proben wurden dreimal 1 min bei höchster Intensität beschallt. Nach der Zugabe von 650 µl einer Chloroform-Methanol-Lösung (1:2) zu jeder Probe, wurden diese über eine Stunde extensiv alle 15 min geschüttelt. Die Proben wurden nun bei 14000 g für 2 min zentrifugiert und die Überstände in Röhrchen transferiert, die 100 µl deionisiertes Wasser und 200 µl Chloroform enthielten. Die untere hydrophobe Phase wurde in Borosilikatröhrchen transferiert, den Eppendorfröhrchen erneut 200 µl Chloroform zugefügt und die Extraktionsprozedur wiederholt. Die Proben in den Borosilikatröhrchen wurden mit einem Vakuumzentrifuge (SC 110) von Savant getrocknet und anschließend in 150 µl Azetonitril aufgenommen, in Mikroröhrchen transferiert und mit dem HPLC-System separiert.

3.8. Freisetzungsstudien

Der Nachweis der Freisetzung der gespeicherten Vitamin D₃ Analoga wurde sowohl mittels Lichtmikroskopie und Spektrofluorometrie als auch mit Transaktivierungsassays sofern möglich durchgeführt.

Für den mikroskopischen Nachweis wurden die differenzierten Adipozyten in gekammerte Glasobjekträger transferiert und für einen Tag mit 100 nM BODIPY-markierten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. für 4 Tage mit 100 nM BODIPY-markierten Vitamin D₃ in

Medium IV inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit hormonfreiem Medium IV gewaschen und in diesem auch weiterkultiviert. Das Nährmedium wurde täglich über den Zellen gewechselt. Die Mikroskopie erfolgte wie bereits oben beschrieben mit einem Zeiss Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop.

Bei der quantitativen Bestimmung der freigesetzten Hormone mittels Spektrofluorometrie wurden Adipozyten für 4 Tage mit 10 nM BODIPY-markierten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. 100 nM BODIPY-markierten Vitamin D₃ in Medium IV inkubiert. Es wurde nach der Inkubationsphase das Medium IV täglich gewechselt. Die Messung mit dem Spektrofluorometer erfolgte wie unter 2.5. beschrieben.

Die quantitative Bestimmung der freigesetzten Hormone mittels Transaktivierungsassay war lediglich für 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ möglich, da Vitamin D₃ und 25-Hydroxyvitamin D₃ die Gentranskription nicht in ausreichendem Maß aktivieren. Die differenzierten Adipozyten wurden für diese Studie in 6-Lochplatten subkultiviert und für 3 Tage mit 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inkubiert. Danach wurde das hormonhaltige Medium entfernt und durch ein Medium IV ähnliches Medium, welches allerdings nur Charcoal-Kälberserum ohne eigenen Vitamin D₃ Anteil enthält, ersetzt. Nach 24 Stunden bzw. 3 Tagen, in denen ein täglicher Wechsel des Mediums erfolgte, wurde der Mediumüberstand auf ROS AI Zellen übertragen, die ebenfalls zuvor in 12-Lochplatten subkultiviert worden waren. ROS AI Zellen leiten sich von Rattenosteosarkomzellen ab, die stabil das Reporterplasmid p24OH/Luc-23 (ein Geschenk von H.F. DeLuca, University of Wisconsin, Madison, WI) exprimieren. Wie bereits unter 2.3. beschrieben verschlüsselt das p24OH/Luc-23 Plasmid ein Luziferasegen, welches unter der Kontrolle des 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase Promotors steht. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen dann entsprechend dem unter 2.3. stehenden Protokoll lysiert und anschließend mit dem Luminometer gemessen. Die freigesetzten Hormonkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Standardkurve aus den gemessenen Luziferaseaktivitäten ermittelt.

Der Einfluß anderer Hormone oder Pharmaka auf die Freisetzung der BODIPY-Calcitriols wurde ebenfalls mittels Transaktivierungsassay und unter den gleichen soeben beschriebenen Bedingungen getestet. Während bei der mikroskopischen Auswertung die Zellen sowohl nach 2 Stunden als auch nach 24 Stunden untersucht wurden, erfolgte die Auswertung mittels Transaktivierungsassay lediglich nach 24 Stunden. Die im Folgenden aufgeführten Substanzen wurden in die Untersuchung mit einbezogen:

- Isoproteranol von Sigma; Konzentration: 10⁻³ M
- Leptin von Calbiochem; Konzentration: 10⁻⁸ M

- PTH (Parathyreoidhormon) Fragment 1-34 von Sigma; Konzentration: 10^{-6} M
- Melatonin von Calbiochem; Konzentration: 10^{-4} M
- Arterenol von Sigma; Konzentration: 10^{-3} M
- LTH (Luteotropes Hormon) bzw. Prolaktin von Sigma; Konzentration: 10^{-7} M

3.9. Statistische Auswertung

Die ermittelten Werte wurden mittels EDV (Microsoft Excel) statistisch aufgearbeitet. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm 1 Standardabweichung präsentiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden durch den Student's t-Test ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Morphologie des Zellsystems

Das für diese Arbeit genutzte Zellsystem entsprach Adipozyten aus der 3T3-L1 Zelllinie, die sich aus pluripotenten Fibroblasten entwickelten. Sobald die Fibroblasten vom rapiden Teilungsstadium in das konfluente kontaktinhibierte Stadium übertraten, änderte sich die Morphologie der Zellen und sie differenzierten sich über das Stadium der Präadipozyten innerhalb von ca. 6 Tagen nach Erreichen der Konfluenz zu Adipozyten.

Die Fibroblasten stellten sich wie in Abb. 2a abgebildet als schmale langgestreckte Zellen mit einem zentral liegenden Zellkern dar. In der Länge maßen sie 50 μm bis 130 μm und um den Kern hatten sie eine maximale Ausdehnung von 10 μm bis 20 μm . Nachdem die Fibroblasten das Konfluenzstadium erreichten, begannen die Zellen sich abzurunden und im Stadium der Präadipozyten ließen sich erste Fetttropfen in den Zellen nachweisen. Die Zahl dieser Fetttropfen nahm über die nächsten Tage noch zu, und kleinere Tropfen verschmolzen zu einigen großen Tropfen. Die Differenzierung der Adipozyten war durchschnittlich 5-7 Tage nach Erreichen der Konfluenz abgeschlossen. Die Zellen stellten sich dann wie in Abb. 2b abgebildet als polyvakuoläre Fettzellen mit einem zentral gelegenen Kern und einem Durchmesser von ca. 20 μm bis 60 μm dar. Um zu zeigen, dass es sich bei den abgebildeten Vakuolen, die einen Durchmesser von bis zu 10 μm erreichten, um Fetttropfen handelt, wurde eine Fettfärbung mit Sudan III durchgeführt. Wie für diese Färbung typisch, stellten sich die Fetttropfen rötlich dar.

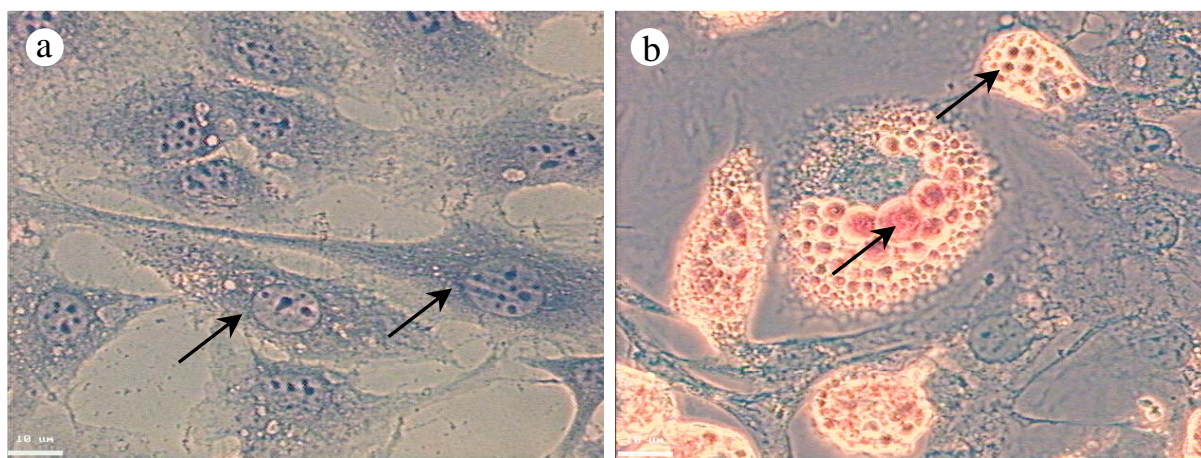


Abb. 3: Fettfärbung der undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen

a: Undifferenzierte Fibroblasten von Mäuseembryonen. Es sind gut die langgezogenen Zellen (Pfeile) mit ihren Zellkernen zu erkennen. Fettvakuolen stellen sich jedoch nicht dar.

b: Adipozyten, die sich aus den Fibroblasten differenziert haben. Durch die Sudan-III- Färbung stellen sich die Fettvakuolen rot dar (Pfeile).Balken: 10 μm

4.2. Speicherung der intakten BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga

Da BODIPY®581/591 durch eine Esterbindung an die Vitamin D₃ Analoga gekoppelt war, bestand die Möglichkeit, dass diese Verbindungen durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert würden. Dann hätte man in der Spektrofluorometrie und der Mikroskopie lediglich den rot fluoreszierenden BODIPY-Marker nachgewiesen, ohne dabei die Vitamin D₃ Analoga zu messen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Adipozyten mit den BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga inkubiert und anschließend extrahiert. Die Komponenten wurden mit Hilfe der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) separiert und die Absorption der Vitamin D₃ Analoga bei 254 nm und des BODIPY-Markers bei 584 nm gemessen.

Alle fluoreszierenden Vitamin D₃ Analoga eluierten als intakte Verbindungen, wie an den zeitgleichen Absorptionsmaxima der Komponenten zu erkennen ist. Die einzelnen fluoreszierenden Vitamin D₃ Analoga wurden durch mitlaufende Standards, die zur gleichen Zeit eluierten, identifiziert. Unmarkierte Vitamin D₃ Verbindungen hatten ihre Absorptionsmaxima zu einem früheren Zeitpunkt als die jeweils entsprechenden BODIPY-markierten Verbindungen, da diese hydrophiler waren und somit in der unpolaren Säule früher eluierten.

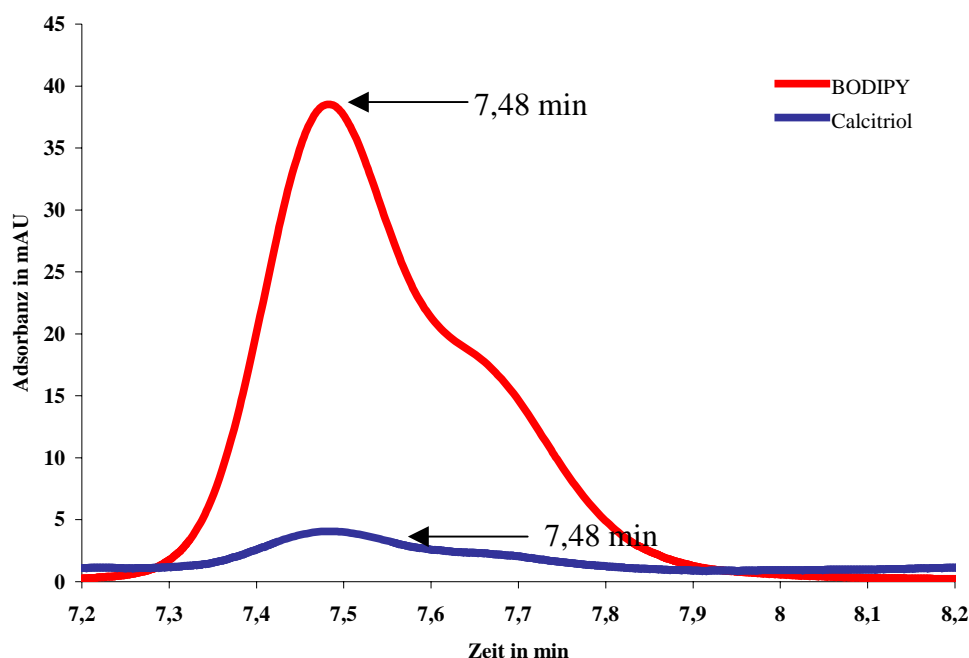


Abb. 4: HPLC des BODIPY-markierten 1,25-Dihydroxyvitamins D₃

Die intakte Verbindung eluierte nach 7,48 min. Rot dargestellt die Absorption der BODIPY-Komponente, gemessen bei 584 nm, und blau dargestellt die Absorption des 1,25-Dihydroxyvitamins D₃, gemessen bei 254 nm.

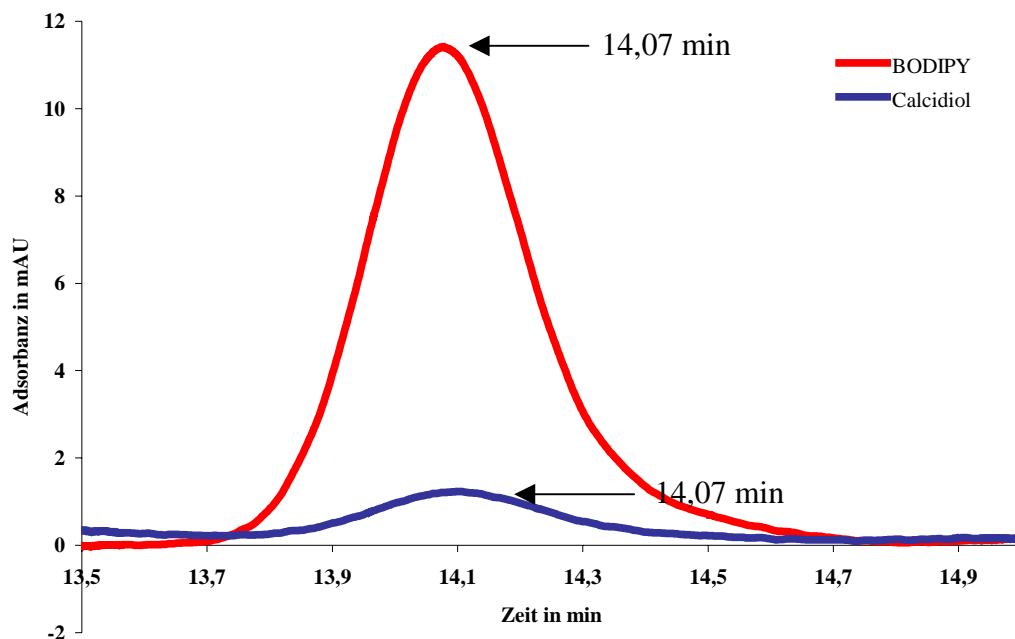


Abb. 5: HPLC des BODIPY-markierten 25-Hydroxyvitamins D₃

Die intakte Verbindung eluierte nach 14,07 min. Rot dargestellt die Absorption der BODIPY-Komponente, gemessen bei 584 nm, und blau dargestellt die Absorption des 25-Hydroxyvitamins D₃, gemessen bei 254 nm.

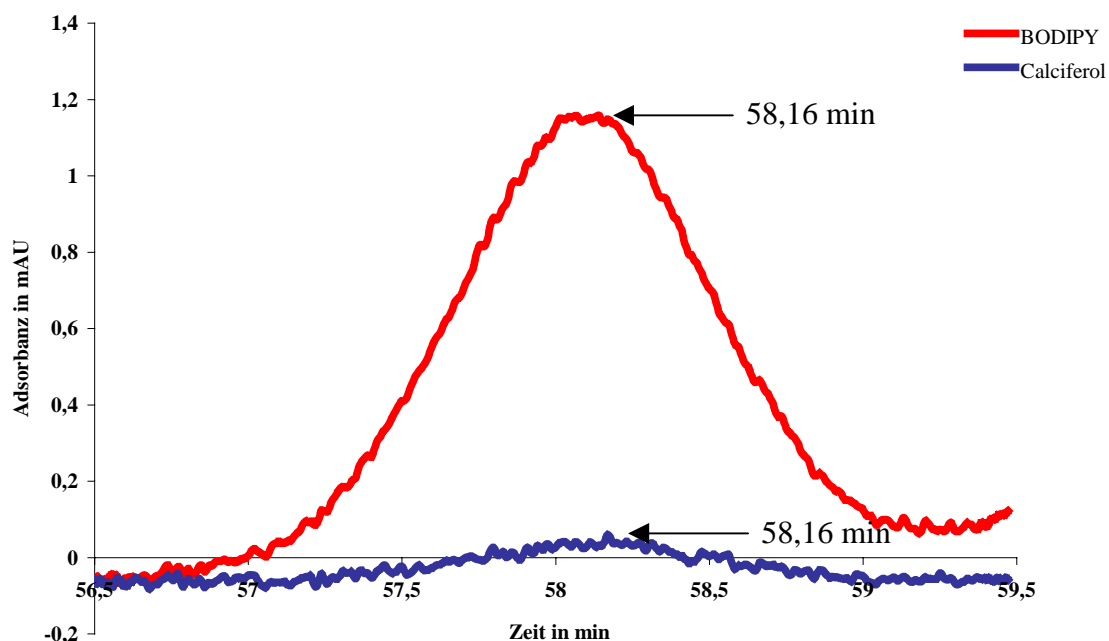


Abb. 6: HPLC des BODIPY-markierten Vitamins D₃

Die intakte Verbindung eluierte nach 58,16 min. Rot dargestellt die Absorption der BODIPY-Komponente, gemessen bei 584 nm, und blau dargestellt die Absorption des Vitamins D₃, gemessen bei 254 nm.

4.3. Aktivitätsnachweis des fluoreszierenden 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Da 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die biologisch aktive Form des Vitamin D₃ ist, sollte getestet werden, ob auch die BODIPY-markierte Form in der Lage wäre, an den VDR zu binden und dadurch eine Transkription verschiedener Zielgene zu initiieren. Diese Genaktivierung kann im Transaktivierungsassay bestimmt werden. Dazu wurden CV-1 Zellen mit verschiedenen Dosen des unmarkierten bzw. des markierten Calcitriols inkubiert, dann lysiert und anschließend im Transaktivierungsassay miteinander verglichen.

Nicht nur das unmarkierte Calcitriol sondern auch das fluoreszierende Analogon waren in der Lage die Gentranskription zu aktivieren. Mit zunehmender Dosis stieg auch das Ausmaß der Aktivierung in beiden Fällen an. Während im Bereich der niedrigeren Dosen das fluoreszierende Calcitriol nicht vollständig die Aktivität des unmarkierten Calcitriols erreichte, hatten die beiden Substanzen bei 100 nM annähernd die gleiche Aktivität und bei der relativ hohen Dosis von 1000 nM übertraf das fluoreszierende Calcitriol sogar die unmarkierte Form. Insgesamt trat jedoch eine Sättigung der Genaktivierung auf. Da bei 100 nM die biologische Aktivität der beiden Substanzen vergleichbar hoch war, benutzten wir für unsere weiteren Experimente diese Dosis.

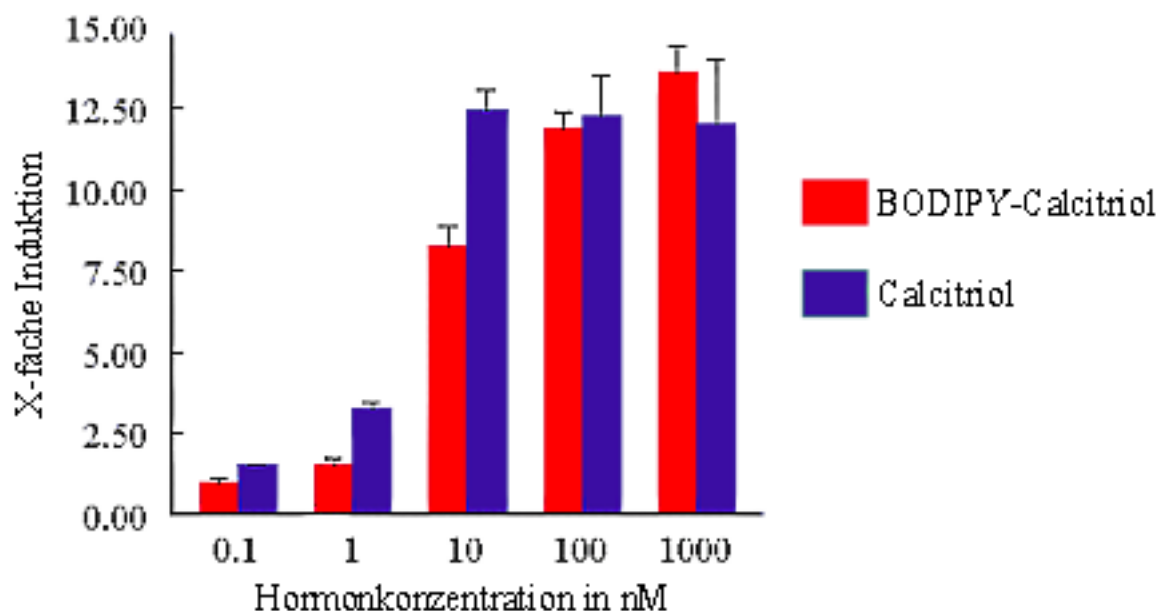


Abb. 7: Transaktivierungsassay des unmarkierten und des BODIPY-markierten Calcitriols
Dargestellt ist die Aktivierung der Transkription des Luzferasegens als X-fache Induktion über der Kontrolle in Abhängigkeit von der Dosis und der Substanz.
Mit zunehmender Konzentration der Hormone steigt auch die Transkriptionsaktivität.

4.4. Mikroskopische Untersuchung der Aufnahme der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in Adipozyten

Um einen Einblick in die intrazelluläre Verteilung der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in Adipozyten zu erhalten, führten wir zunächst eine qualitative Auswertung der Aufnahme und Speicherung der Hormone mittels Fluoreszenzmikroskopie durch.

Dazu wurden differenzierte Adipozyten für sechs Stunden, einen Tag bzw. fünf Tage mit 100 nM des jeweiligen BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analogons oder Ethanol, das als Kontrolle diente, inkubiert. Zur besseren Darstellung der einzelnen Zellen wurden vor der mikroskopischen Auswertung die Zellkerne mit Hoechst Farbstoff 33342 gefärbt, was sich in einer blauen Fluoreszenz äußerte. Im Gegensatz dazu stellten sich die BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga rot fluoreszierend dar.

Wie in den Abbildungen 8 und 9 zu sehen, wurden alle BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in die Fettzellen aufgenommen. Dennoch bestanden Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen. Während sich sowohl Calcitriol als auch Calcidiol bereits innerhalb der ersten sechs Stunden in den Lipidtropfen (Pfeile) der Adipozyten anreicherten, fand man Calciferol zu diesem Zeitpunkt lediglich in Kompartimenten im Zytoplasma. Erst nach einem Tag konnte man hier die ersten Anzeichen der Aufnahme und Speicherung des Calciferols in die Lipidtropfen beobachten und selbst nach fünf Tagen schien die Aufnahme des Calciferols nicht die des Calcitriols nach sechs Stunden zu übersteigen. Anders als beim Calciferol, bei dem sich über den gesamten Zeitraum die zytoplasmatischen Spotts darstellten, war beim Calcitriol neben der Aufnahme in die Lipidtropfen auch eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung festzustellen, die sich jedoch nach fünf Tagen nicht mehr nachweisen ließ. Es wurde keine Fluoreszenz in den Zellkernen detektiert. Calcidiol schien von Anfang an lediglich in die Lipidtropfen der Adipozyten aufgenommen zu werden. Insgesamt schien es jedoch, dass die Fluoreszenzintensität aller drei Stoffe über den Verlauf der 6 Tage zunahm, was einer zunehmenden Speicherung der BODIPY-markierten Hormone entsprach.

Da in den Kontrollen im Längenwellenbereich des roten Lichtes kein Signal zu detektieren war, sind die Fluoreszenz der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga als spezifisch anzusehen und Artefakte durch Autofluoreszenz von Zellbestandteilen auszuschließen.

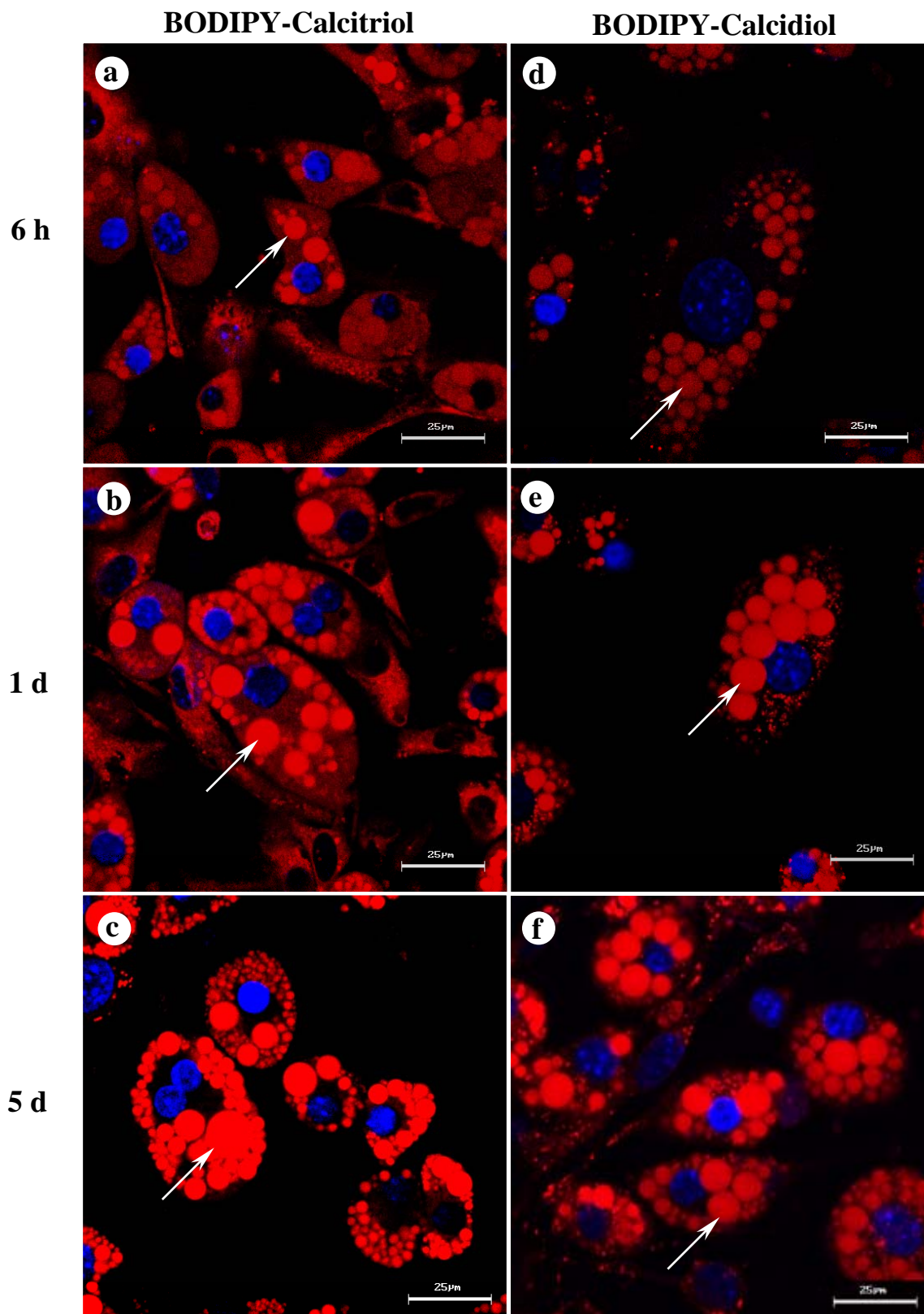


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopie der mit BODIPY-Calcitriol (a-c) und BODIPY-Calcidiol (d-f) inkubierten Adipozyten. Die Zellkerne, die sich blau präsentieren, wurden mit Hoechst Farbstoff 33342 gefärbt. (Balken: 25 μm)

Rot dargestellt ist die zunehmende Fluoreszenzintensität der Fettvakuolen (Pfeile) in den Adipozyten nach einer Inkubationszeit von jeweils 6 Stunden (a;d), 1 Tag (b;e) bzw. 5 Tagen (c;f).

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität entspricht einer zunehmenden Speicherung der BODIPY-markierten Hormon.

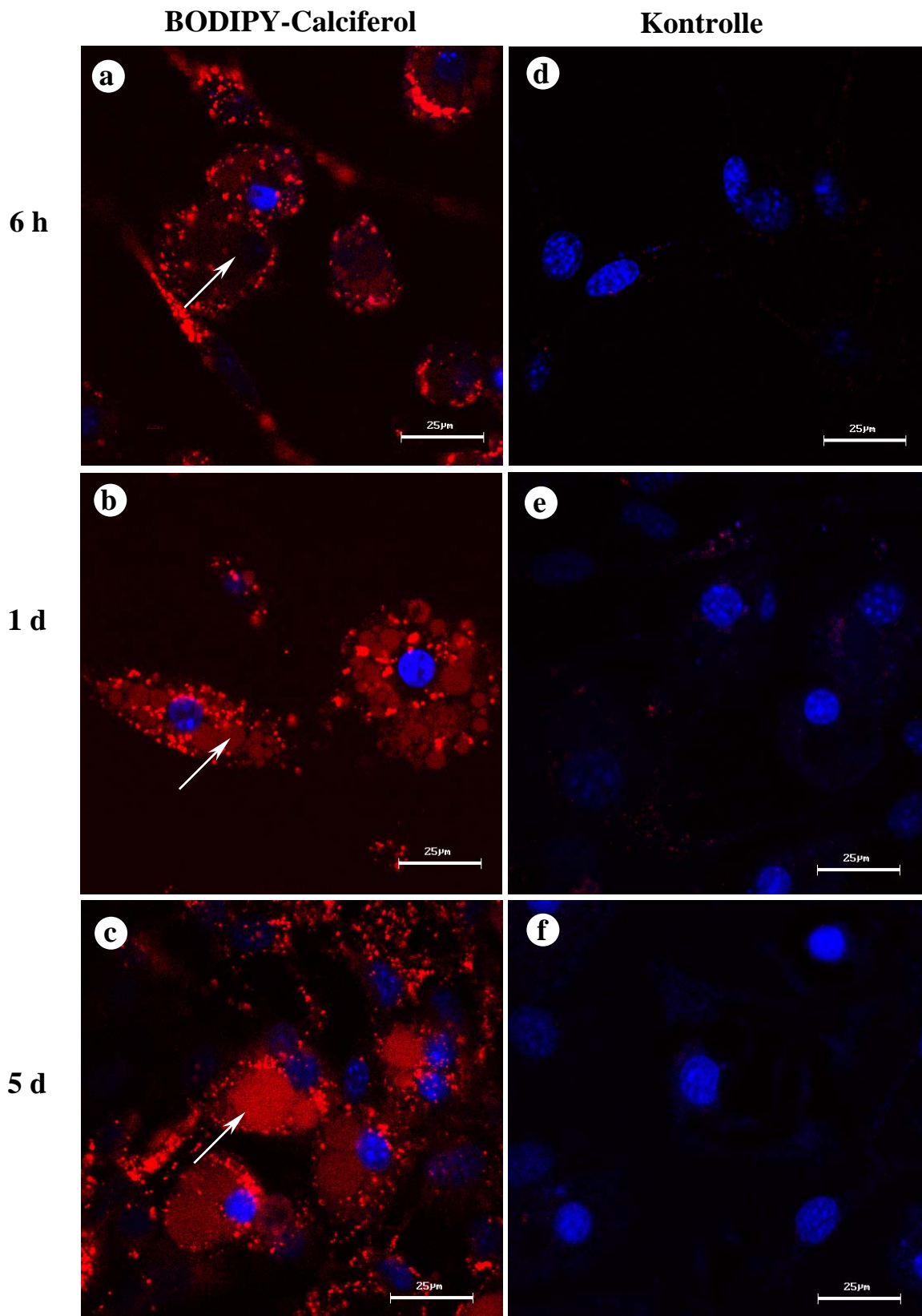


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopie der mit BODIPY-Calciferol (a-c) und Ethanol als Kontrolle (d-f) inkubierten Adipozyten. Die Zellkerne, die sich blau präsentieren, wurden mit Hoechst Farbstoff 33342 gefärbt. (Balken: 25 μm)

Rot dargestellt ist die zunehmende Fluoreszenzintensität der Fettvakuolen (Pfeile) in den Adipozyten nach einer Inkubationszeit von jeweils 6 Stunden (a), 1 Tag (b) bzw. 5 Tagen (c). Die Zunahme der Fluoreszenzintensität entspricht einer zunehmenden Speicherung der BODIPY-markierten Hormone. In den Kontrollen sind lediglich die Zellkerne zu erkennen.

4.5. Akkumulation des BODIPY-Markers in Adipozyten

Da bei der Fluoreszenzmikroskopie schon Unterschiede in der Aufnahme der einzelnen BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga auffielen, war es wahrscheinlich, dass die Vitamin D₃ Komponente und nicht der BODIPY-Marker die intrazelluläre Lokalisation bestimmten. Um diesen Aspekt sicher ausschließen zu können, wurden Adipozyten ebenfalls für sechs Stunden, einen Tag bzw. fünf Tage mit 100 nM BODIPY®581/591 inkubiert. Die Zellkerne wurden direkt vor der Mikroskopie, wie im vorigen Abschnitt erwähnt, behandelt. Abbildung 10 zeigt die Adipozyten nach einer Inkubationszeit von einem Tag. Die mikroskopischen Ergebnisse nach 6 Stunden bzw. fünf Tagen sind nicht abgebildet, jedoch mit dem dargestellten Ergebnis vergleichbar.

Auffällig war die geringere Signalintensität der mit dem BODIPY-Marker inkubierten Adipozyten im Vergleich zu den mit BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga inkubierten Zellen. Außerdem reicherte sich der BODIPY-Marker lediglich im Cytoplasma an und sparte die Vakuolen aus. Das lichtmikroskopische Bild zeigt, dass es sich bei diesen Vakuolen um die Lipidtropfen der Adipozyten handelte. Somit war sowohl die intrazelluläre Lokalisation in den Lipidtropfen als auch die höhere Konzentration der aufgenommenen Substanz spezifisch für die Vitamin D₃ Komponente.

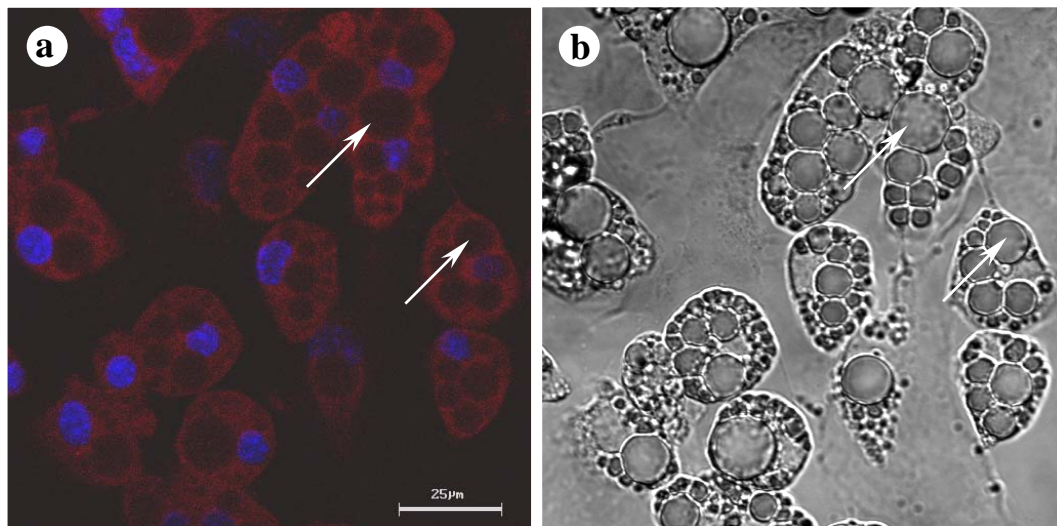


Abb. 10: Fluoreszenz- (a) und Lichtmikroskopie (b) der mit dem BODIPY-Marker inkubierten Adipozyten. Die Zellkerne, die sich blau präsentieren, wurden mit Hoechst Farbstoff 33342 gefärbt. (Balken: 25 µm)
Der BODIPY-Marker verteilt sich lediglich im Cytoplasma, während die Fettvakuolen (Pfeile) keinerlei Signalintensität aufweisen. In der Lichtmikroskopie bestätigt sich, dass es sich bei den in der Fluoreszenzmikroskopie ausgesparten Vakuolen um Lipidtropfen (Pfeile) handelt.

4.6. Spektrofluorometrische Untersuchung der Aufnahme der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in Adipozyten und Fibroblasten

Mit den spektrofluorometrischen Messungen konnten die bereits in der Fluoreszenzmikroskopie auffallenden Unterschiede in der Aufnahme und Speicherung der jeweiligen BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in den Adipozyten quantitativ ausgewertet werden. Dazu wurden differenzierte Adipozyten für verschieden lange Zeitintervalle mit 100 nM der verschiedenen fluoreszierenden Hormone inkubiert und anschließend wie im Kapitel 2 beschrieben für die Spektrofluorometrie vorbereitet. Zum Vergleich wurden außerdem auch Fibroblasten unter gleichen Bedingungen mit den Hormonen inkubiert und untersucht.

Die Abbildungen 11 bis 13 zeigen die Aufnahme und Speicherung der einzelnen BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga über einen Zeitraum von 8 Tagen in Adipozyten und Fibroblasten. Erwartungsgemäß wurde in allen Fällen mehr Hormon in die Adipozyten aufgenommen als in die Fibroblasten, da schon mikroskopisch eine Anreicherung der Vitamin D₃ Analoga in den Lipidtropfen nachgewiesen worden war. Während jedoch bei der Aufnahme des BODIPY-markierten 1,25-Dihydroxyvitamins D₃ (BODIPY-Calcitriol) in die Adipozyten und Fibroblasten keine Sättigung auftrat, konnte man sowohl bei dem BODIPY-markierten 25-Hydroxyvitamin D₃ (BODIPY-Calcidiol) als auch bei dem BODIPY-markierten Vitamin D₃ (BODIPY-Caciferol) eine Sättigung der Adipozyten nach ca. 4 Tagen beobachten. Auch die Aufnahme in Fibroblasten zeigte in diesen Fällen eine Sättigungskinetik. Die intrazellulären Konzentrationen von BODIPY-Calcidiol und BODIPY-Calciferol pegelten sich allerdings auf einem niedrigen Niveau ein und die Fibroblasten erschienen bereits nach einem Tag gesättigt zu sein. In Abbildung 13 konnten keine Messwerte der frühen Aufnahme des BODIPY-Califerols bestimmt werden, da die Aufnahme dieses Hormons am ersten Tag so gering war, dass sie sich mit unserer Messtechnik nicht nachweisen ließ.

Eine vergleichende Betrachtung der Aufnahme der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in die Adipozyten ist in Abbildung 14 aufgeführt. Es ist gut erkennbar, dass die Adipozyten alle drei fluoreszierenden Hormone über die Zeit (im Vergleich nach 1 Tag und nach 4 Tagen) zunehmend angereichert bzw. gespeichert hatten. Sowohl nach einem als auch nach vier Tagen hatten die Zellen vorwiegend BODIPY-Calcitriol aufgenommen. Nach 4 Tagen überstieg die Konzentration des BODIPY-Calcitriols in den Adipozyten die des BODIPY-Calcidiols um das 2,7fache und die des BODIPY-Calciferols sogar um das 4,6fache.

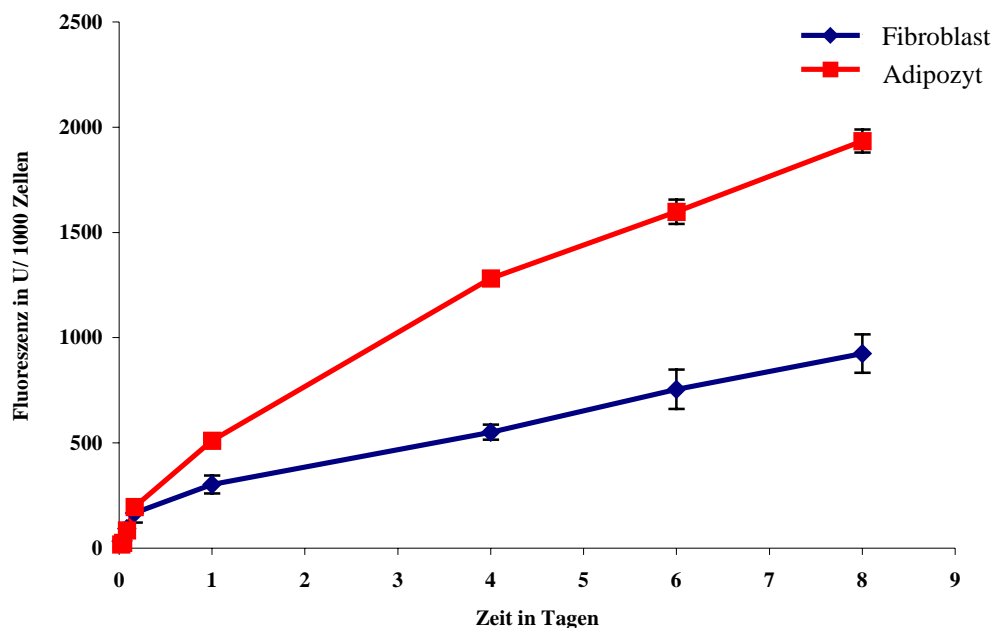


Abb. 11: Spektrofluorometrische Messung der Aufnahme und Speicherung des BODIPY-markierten 1,25-Dihydroxyvitamins D_3 in Adipozyten und Fibroblasten. Über den gesamten Zeitraum stieg die Konzentration des Hormons in beiden Zellarten an und es trat keine Sättigung der Zellen auf. Jedoch wurde insgesamt mehr Hormon in die Adipozyten aufgenommen als vergleichsweise in die Fibroblasten.

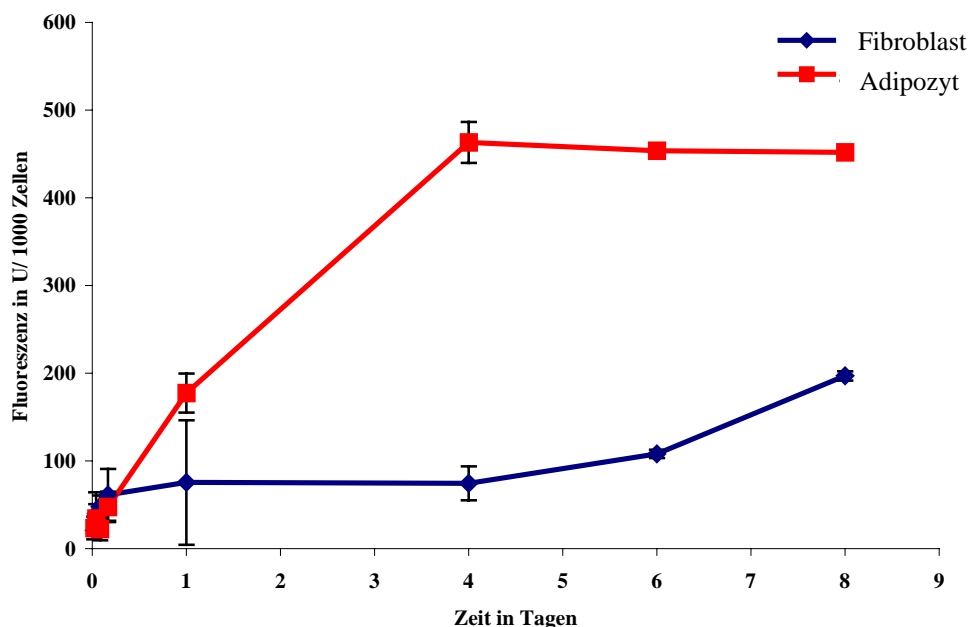


Abb. 12: Spektrofluorometrische Messung der Aufnahme und Speicherung des BODIPY-markierten 25-Hydroxyvitamins D_3 in Adipozyten und Fibroblasten. Zunächst war ein Anstieg der Konzentration des Hormons in den Adipozyten zu verzeichnen. Nach ca. 4 Tagen schienen die Zellen jedoch aufgesättigt zu sein und die Konzentration blieb in den Zellen über den verbleibenden Zeitraum konstant. Die Fibroblasten nahmen das Hormon kaum auf und die Konzentration in den Zellen verblieb auf einem niedrigen Niveau.

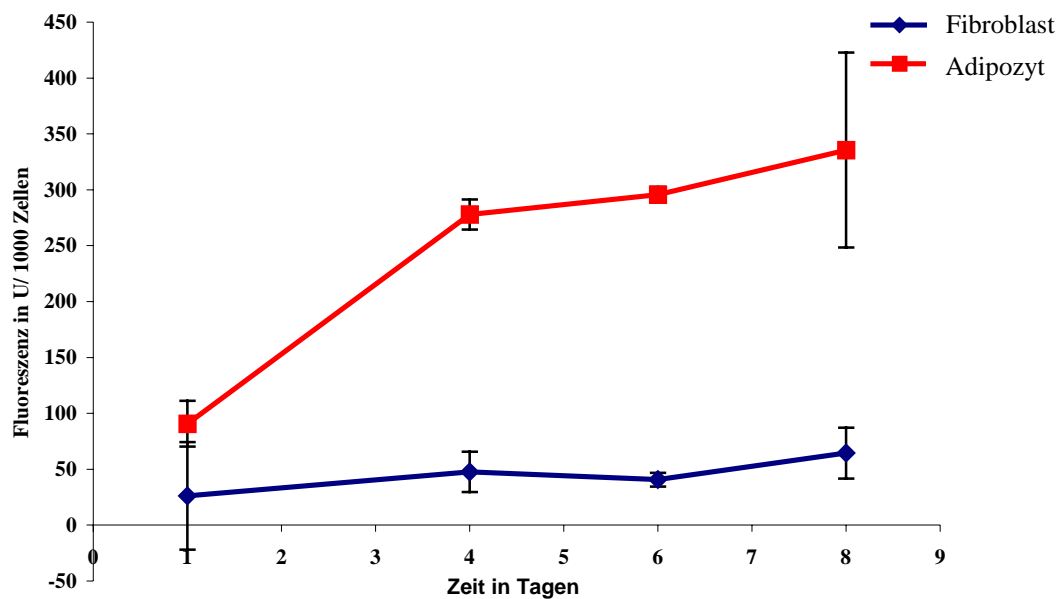


Abb. 13: Spektrofluorometrische Messung der Aufnahme und Speicherung des BODIPY-markierten Vitamins D₃ in Adipozyten und Fibroblasten. Zunächst zeigte sich ein steiler Anstieg der Hormonkonzentration in den Adipozyten. Nach ca. 4 Tagen sank dann jedoch die Aufnahmegeschwindigkeit ab und es schien eine gewisse Sättigung aufzutreten. In die Fibroblasten wurde vergleichsweise wenig Hormon aufgenommen.

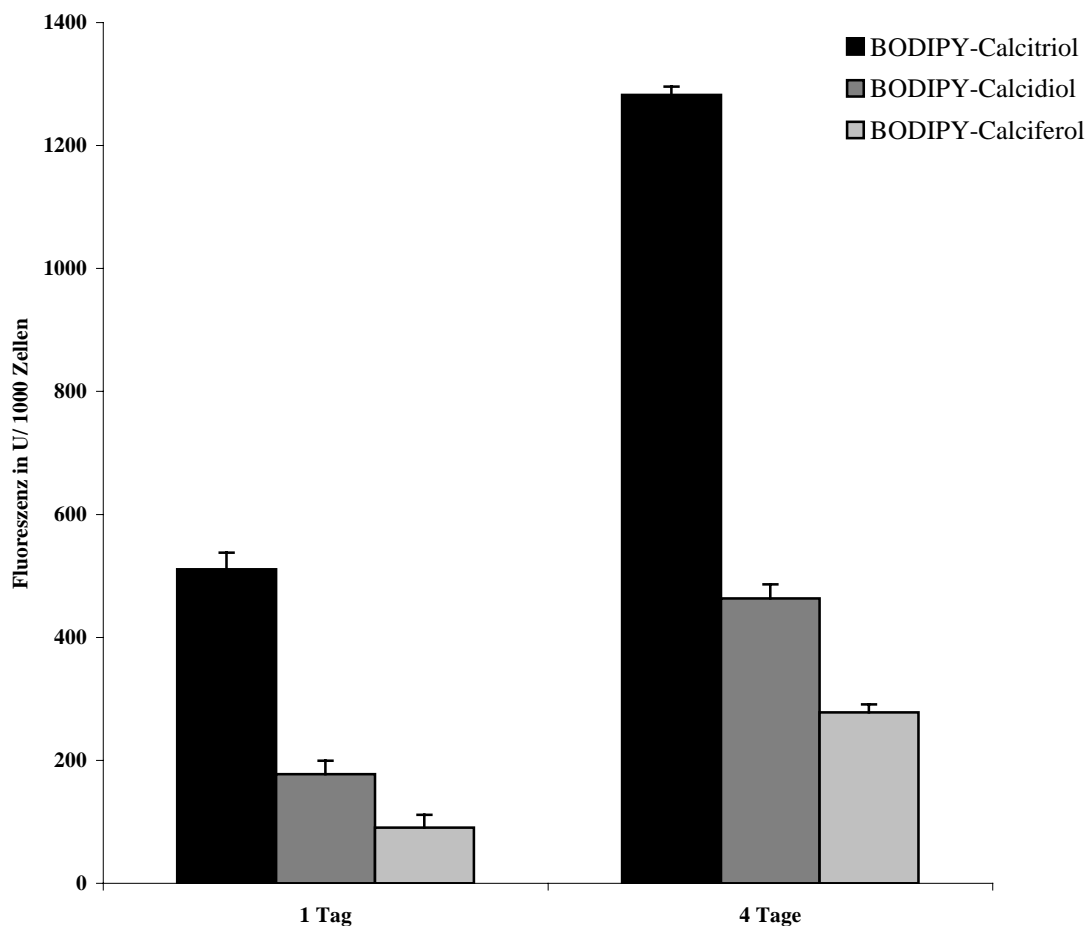


Abb. 14: Vergleich der spektrofluorometrisch gemessenen Aufnahme der einzelnen BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in Adipozyten nach verschiedenen Zeitintervallen. Die Adipozyten speicherten über die Zeit zunehmend die fluoreszierenden Hormone. Die höchste Konzentration in den Zellen erreichte BODIPY-Calcitriol. Die Konzentration in den Adipozyten überstieg die des BODIPY-Calcidiols um das 2,7fache und die des BODIPY-Calciferols um das 4,6fache.

4.7. Abhängigkeit der Aufnahme des BODIPY-Calcitriols in Adipozyten von verschiedenen Faktoren

Um die Auswirkungen verschiedener Faktoren auf die Aufnahme der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in Adipozyten genauer zu untersuchen, wurden die Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur, der Energiebereitstellung und der extrazellulären Calciumkonzentration mit 50 nM bzw. 100 nM BODIPY-Calcitriol inkubiert.

In Abbildung 15 ist der Einfluss der Temperatur auf die Aufnahme des Hormons dargestellt. Adipozyten, die bei 37°C inkubiert wurden, akkumulierten signifikant mehr BODIPY-Calcitriol als solche, die bei 4°C inkubiert wurden.

Weiterhin war die Aufnahme, zumindest teilweise, auch energieabhängig, wie Versuche mit Natriumazid gezeigt haben (Abb. 16). Natriumazid hemmt in den Mitochondrien die Atmungskette und somit die ATP-Synthese. Dadurch wird die Energiezufuhr der Zelle unterbunden und aktive Transportmechanismen gehemmt. Adipozyten, die mit Natriumazid vorbehandelt wurden, akkumulierten 1,4 mal weniger BODIPY-Calcitriol als die Kontrollgruppe.

Und nicht zuletzt modulieren auch die extrazellulären Calciumkonzentrationen die Aufnahme bzw. die Retention der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in Adipozyten (Abb. 17).

Sowohl hohe Konzentrationen (400 mg/l) als auch die Abwesenheit von extrazellulärem Calcium steigerten signifikant die Aufnahme von BODIPY-Calcitriol.

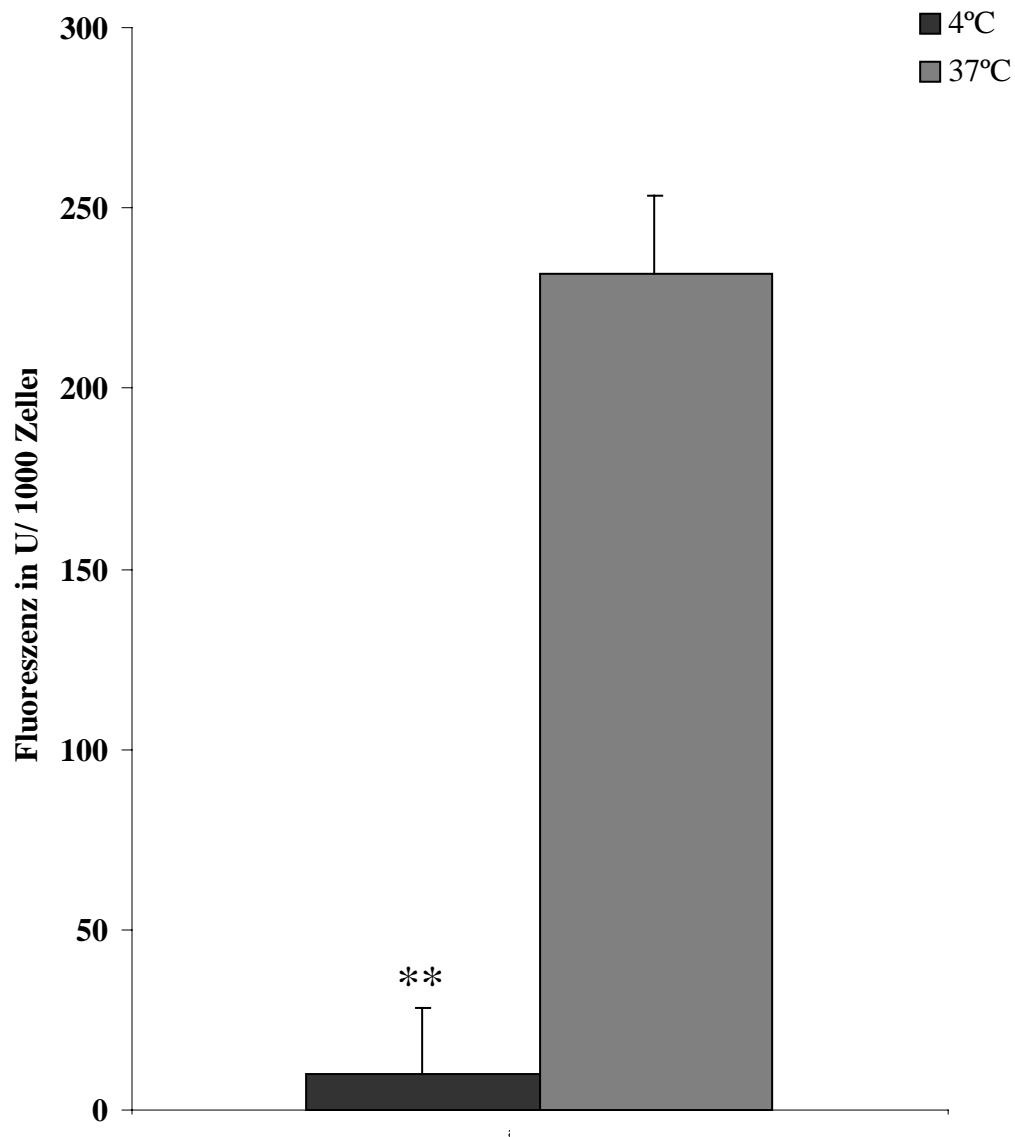


Abb. 15: Aufnahme des BODIPY-Calcitriols in die Adipozyten in Abhängigkeit von der Temperatur. Bei 37°C wurde ca. 23 mal mehr Hormon in die Zellen aufgenommen als bei 4°C.

** $p < 0,001$

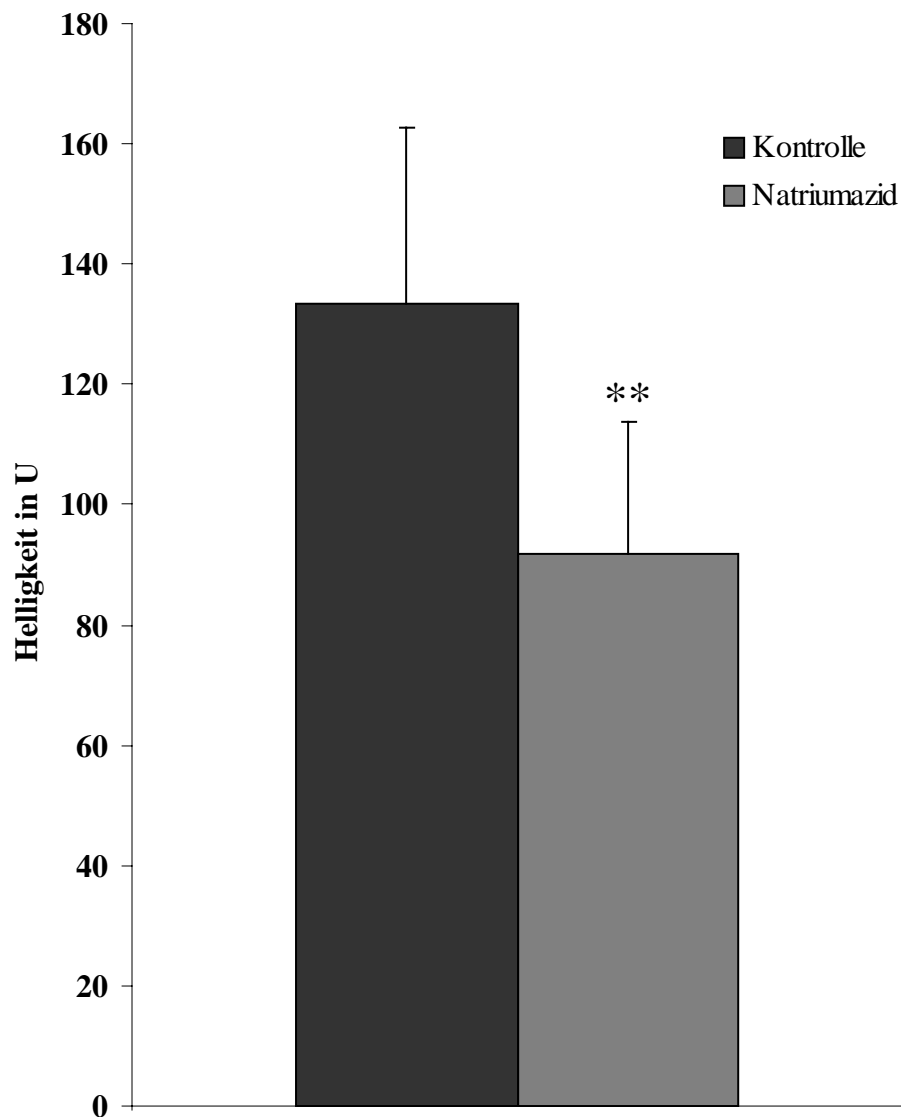


Abb. 16: Aufnahme des BODIPY-Calcitriols in die Adipozyten in Abhängigkeit von energieverbrauchenden Prozessen. Die Aufnahme des Hormons in die Zellen war zumindest teilweise ein energieabhängiger Prozess. Bei Inhibition der Energiebereitstellung durch Natriumazid wurde 1,4 mal weniger BODIPY-Calcitriol in die Zellen aufgenommen.

* $p < 0,001$

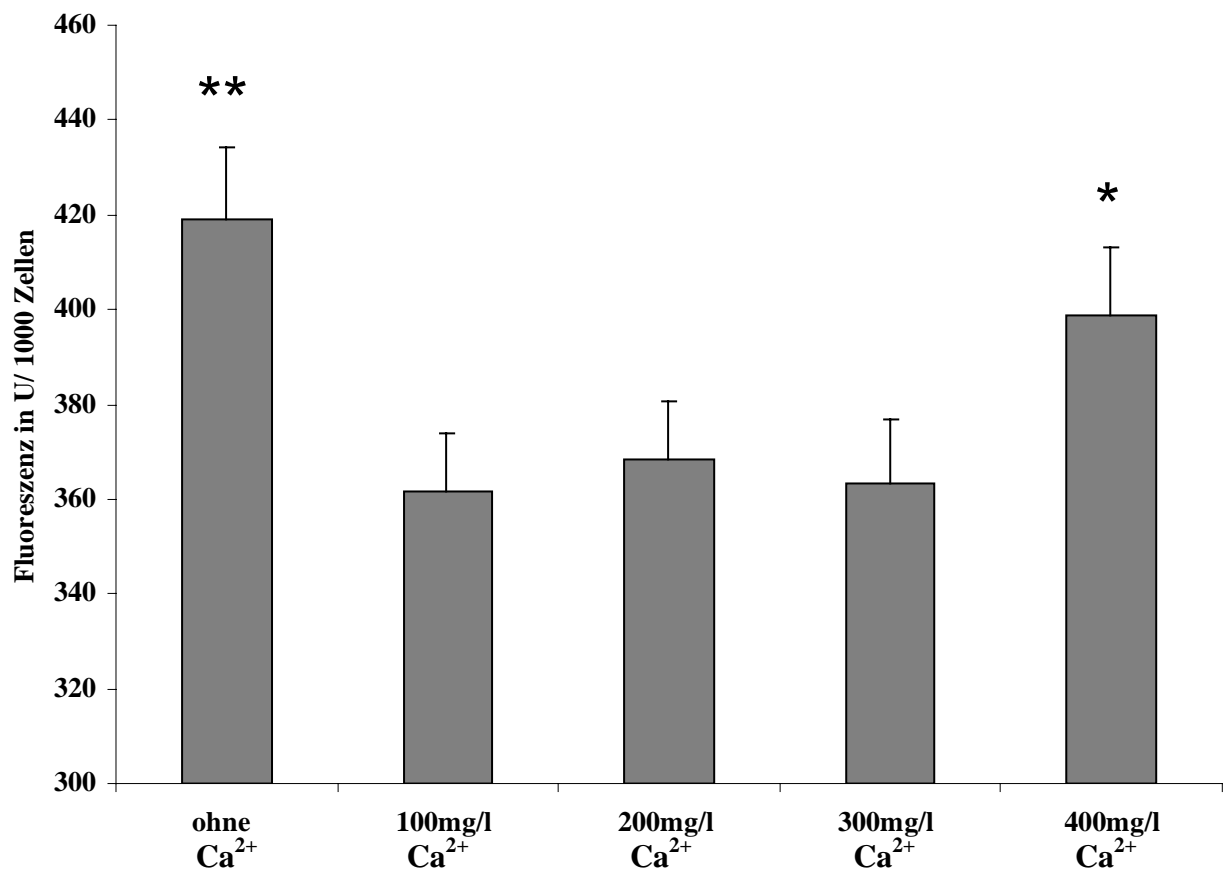


Abb.17: Aufnahme des BODIPY-Calcitriols in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen steigern ebenso wie die Abwesenheit von Calcium die Aufnahme bzw. die Retention des BODIPY-Calcitriols.
** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

4.8. Sättigung der Aufnahme des BODIPY-Calcitriols in Adipozyten

Neben den soeben besprochenen Faktoren war es auch wichtig die Kinetik der Akkumulation genauer zu untersuchen. Dazu wurden Adipozyten sowohl mit 10 nM BODIPY-Calcitriol als auch mit 1nM des unmarkierten Calcitriols bzw. mit dem Vehikel inkubiert. Die spektrofluorometrischen Untersuchungen der Adipozyten zeigten, wie in Abb. 18 zu sehen ist, dass Zellen, die gleichzeitig mit Calcitriol behandelt wurden, weniger BODIPY-Calcitriol akkumulierten als die mit Vehikel inkubierte Vergleichsgruppe. Im Gegensatz zur Vergleichsgruppe, konnten die mit Calcitriol behandelten Zellen nur 70 % der Menge an BODIPY-Calcitriol aufnehmen.

Dieses Ergebnis entsprach dem Bild eines kompetitiven Aufnahmemechanismus.

In Abb. 19 ist die Sättigungskinetik der Aufnahme in einer Konzentrationskurve dargestellt. Die Adipozyten wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des BODIPY-Calcitriols inkubiert und anschließend spektrofluorometrisch ausgewertet.

Während im Bereich zwischen 3 nM und 10 nM mit zunehmender Konzentration auch eine steile Zunahme der Akkumulation des BODIPY-Calcitriols zu verzeichnen war, erschien im höheren Dosisbereich eine Sättigung aufzutreten. Trotz zunehmender Konzentrationen flachte der Kurvenverlauf ab.

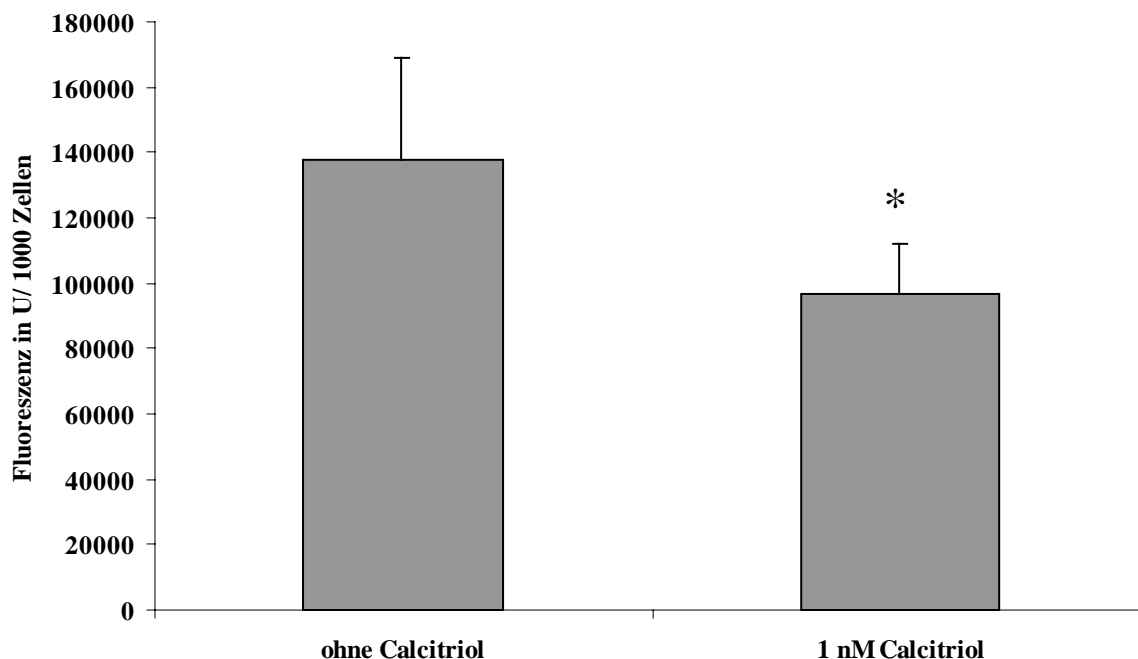


Abb. 18: Sättigung der Aufnahme von BODIPY-Calcitriol in Adipozyten. Zellen, die mit 1nM unmarkierten Calcitriol inkubiert wurden, akkumulierten nachweislich weniger BODIPY-Calcitriol.

* $p < 0,05$

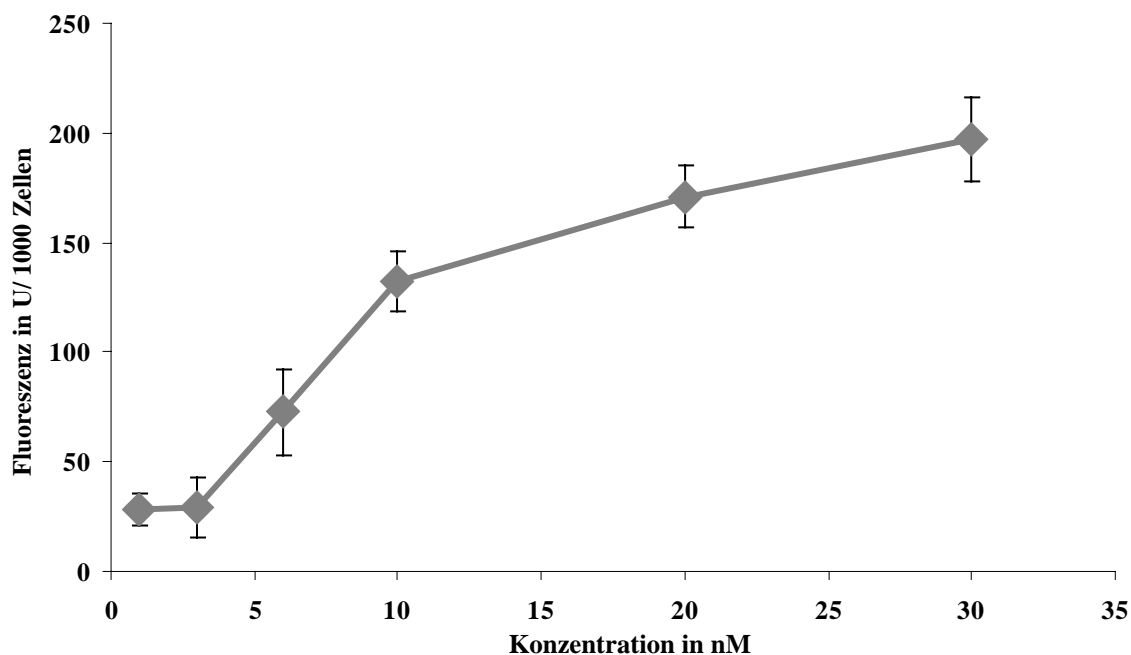


Abb. 19: Sättigungskinetik der Aufnahme von BODIPY-Calcitriol in Adipozyten in Abhängigkeit von der Konzentration. Während bei niedrigeren Konzentrationen zunächst ein starker Anstieg der Akkumulation auffällt, scheint es bei höheren Dosen doch zu einer Sättigung der Aufnahme zu kommen. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve ermittelt.

4.9. Mikroskopische Untersuchung der Freisetzung von BODIPY-Calcitriol und BODIPY-Calciferol aus Adipozyten

Die Adipozyten setzten die gespeicherten BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga nach Beendigung der Inkubation langsam wieder frei. Zur qualitativen Auswertung dieser Freisetzung wurden Adipozyten für einen Tag mit 100 nM BODIPY-Calcitriol bzw. vier Tage mit 100 nM BODIPY-Calciferol inkubiert. Anschließend wurden mikroskopische Bilder direkt im Anschluss an die Inkubationsphase, wie in Abb. 20 a und c zu erkennen ist, und vier Tage danach, wie in Abb. 20 b und d zu erkennen ist, angefertigt.

Wie schon unter 3.4. beschrieben stellten sich die Lipidtropfen der Adipozyten am Ende der Inkubationszeit stark angereichert mit den fluoreszierenden Vitamin D₃ Analoga dar. Während diese Anreicherung bei BODIPY-Calcitriol nach einem Tag schon weit fortgeschritten war, dauerte es bei BODIPY-Calciferol mehrere Tage bis sich die Lipidtropfen mit dem fluoreszierenden Hormon darstellten. Diese Beobachtung erklärt auch die unterschiedliche Inkubationszeit für die beiden Analoga.

Nach vier Tagen war in beiden Fällen anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität in den Lipidtropfen zu erkennen, dass substantielle Mengen der Hormone aus den Adipozyten freigesetzt wurden. Dennoch speicherten die Fettropfen auch weiterhin gewisse Mengen an BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga, so dass sich diese nach wie vor unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellten. Bei den mit BODIPY-Calciferol inkubierten Zellen, konnten neben der Speicherung in den Fettropfen auch zytoplasmatische Kompartimente dargestellt werden.

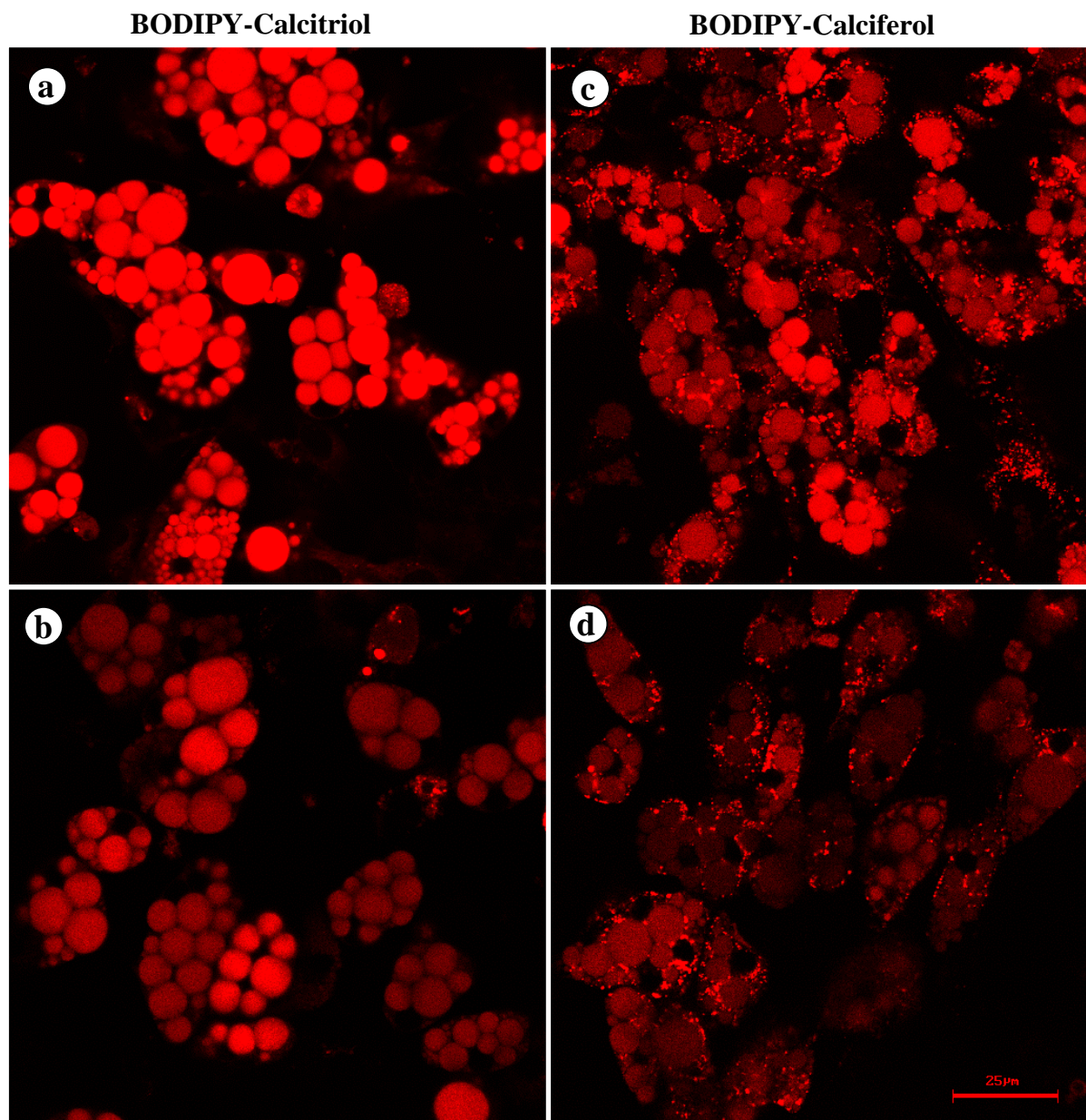


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopie der Freisetzung der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga. (Balken 25 μm)
Adipozyten setzen substantielle Mengen sowohl des BODIPY-Calcitriols als auch des BODIPY-Calciferols nach 4 Tagen frei.
a: Adipozyten direkt nach eintägiger Inkubation mit BODIPY-Calcitriol
b: Adipozyten 4 Tage nach Beendigung der Inkubation mit BODIPY-Calcitriol
c: Adipozyten direkt nach viertägiger Inkubation mit BODIPY-Calciferol
d: Adipozyten 4 Tage nach Beendigung der Inkubation mit BODIPY-Calciferol

4.10. Spektrofluorometrische Untersuchung der Freisetzung von BODIPY-Calcitriol und BODIPY-Calciferol aus Adipozyten

Zur quantitativen Auswertung der Freisetzung der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga, führten wir spektrofluorometrische Untersuchungen durch. Dazu wurden Adipozyten über 4 Tage mit 10 nM BODIPY-Calcitriol bzw. mit 100 nM BODIPY-Calciferol inkubiert. Anschließend wurde über 7 Tage täglich die Freisetzung aus den Zellen gemessen.

Auch bei diesen Untersuchungen war eine eindeutige Freisetzung der Hormone aus den Adipozyten zu verzeichnen. Bei der Freisetzung des BODIPY-Calcitriols konnten, wie in Abb. 21 zu erkennen ist, zwei Phasen unterschieden werden. Zunächst zeigte sich eine rapide Phase, in der innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beendigung der Inkubationszeit ein Großteil des gespeicherten Hormons freigesetzt wurde. Diese Phase ging dann in eine eher langsame Phase der Freisetzung über. Hier wurde über den restlichen untersuchten Zeitraum das BODIPY-Calcitriol nur noch in geringen Mengen aus den Adipozyten freigesetzt.

Das BODIPY-Calciferol hingegen wurde über den gesamten Zeitraum nahezu gleichmäßig und langsam freigesetzt (Abb. 22). Am Ende der 7 Tage Untersuchungszeit waren ca. 40 % des BODIPY-Calciferols und 50 % des BODIPY-Calcitriols aus den Adipozyten freigesetzt.

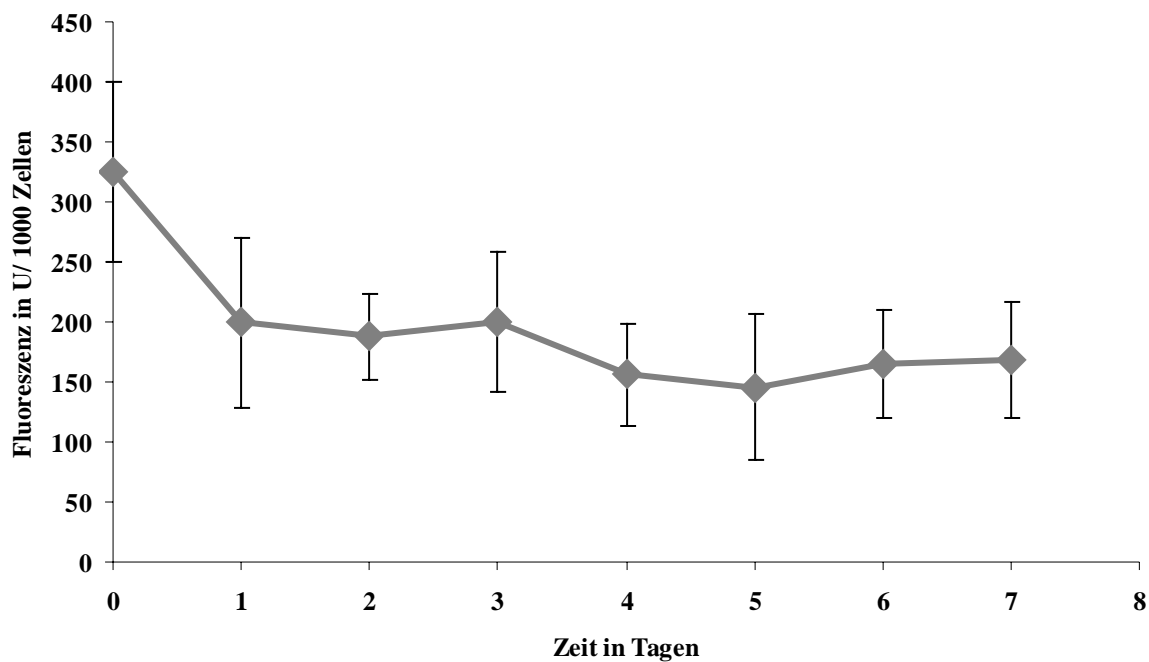


Abb. 21: Spektrofluorometrische Messung der Freisetzung von BODIPY-Calcitriol aus Adipozyten, die zuvor über 4 Tage mit 10 nM desselben inkubiert worden waren. Das Hormon wurde nach einem anfänglich stärkerem Abfall nahezu gleichmäßig über den gemessenen Zeitraum freigesetzt.

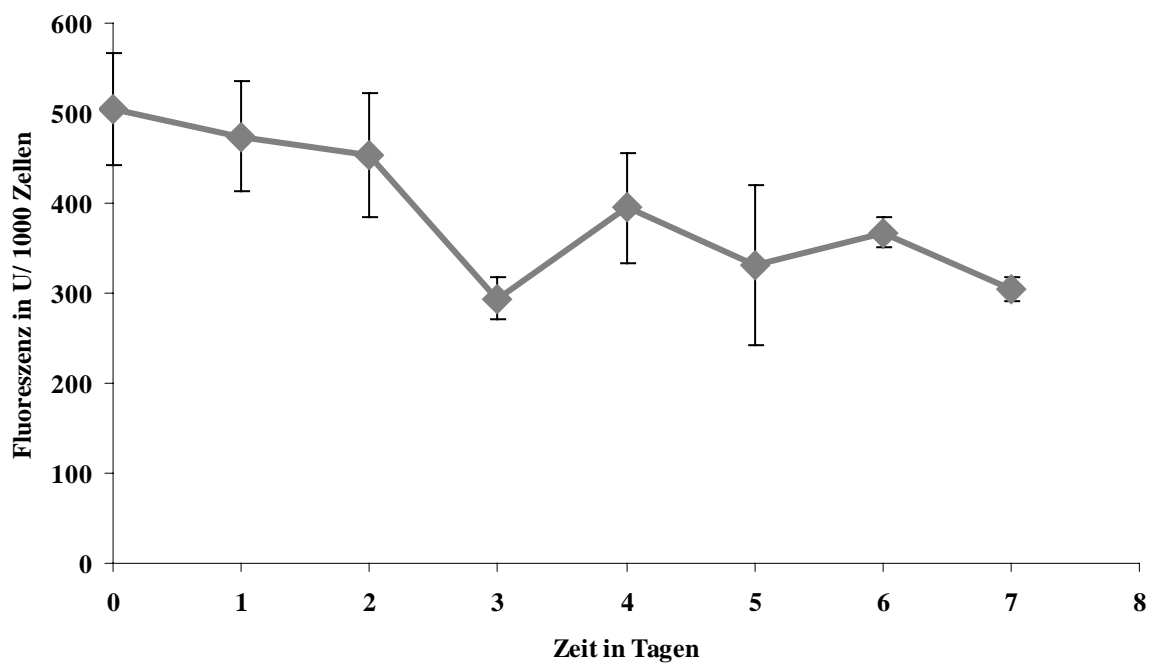


Abb. 22: Spektrofluorometrische Messung der Freisetzung von BODIPY-Calciferol aus Adipozyten, die zuvor über 4 Tage mit 100 nM desselben inkubiert worden waren. Das Hormon wurde über den gemessenen Zeitraum gleichmäßig freigesetzt.

4.11. Freisetzung des biologisch aktiven Calcitriols aus Adipozyten

Da die biologisch aktive Form des Vitamin D₃, das Calcitriol, ebenfalls in den Adipozyten gespeichert und aus diesen auch wieder freigesetzt wurde, war es von großem Interesse, ob das gespeicherte Calcitriol nach seiner Freisetzung immer noch in seiner aktiven Form vorlag und somit auch an Zielorganen wirken könnte.

Für diese Studie wurden Adipozyten für 3 Tage mit 100 nM unmarkierten Calcitriol inkubiert und anschließend wurde die Freisetzung dieses gespeicherten Hormons nach 24 Stunden bzw. 3 Tagen mit Hilfe eines Transaktivierungsassays wie im Kapitel 3.8. beschrieben registriert. Die freigesetzten Hormonkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Standardkurve aus den gemessenen Luziferaseaktivitäten ermittelt.

In den Abbildungen 23 und 24 sind die aus den Adipozyten freigesetzten Konzentrationen des Calcitriols dargestellt. Die Zellen waren entweder mit Calcitriol oder Vehikel (Ethanol) inkubiert worden. Es bestätigten sich die Ergebnisse der mikroskopischen und spektrofluorometrischen Untersuchungen. Calcitriol wurde sowohl nach 24 Stunden als auch nach 3 Tagen aus den Adipozyten freigesetzt. Außerdem war das freigesetzte Hormon biologisch aktiv, da es durch Bindung an einen für das Vitamin D₃ typischen Promotor in der Lage war, die Gentranskription bestimmter Zielzellen, in unserer Studie ROS AI Zellen, zu erhöhen.

Auch übereinstimmend mit den spektrofluorometrischen Untersuchungen war die Freisetzung höherer Konzentrationen des Calcitriols innerhalb des ersten Tages nach Beendigung der Inkubation im Gegensatz zu späteren Zeitpunkten. So wurde nach 24 Stunden ca. 20 pM Calcitriol (Abb. 23) freigesetzt während nach 3 Tagen nur noch etwa 10 pM Calcitriol (Abb. 24) freigesetzt wurde.

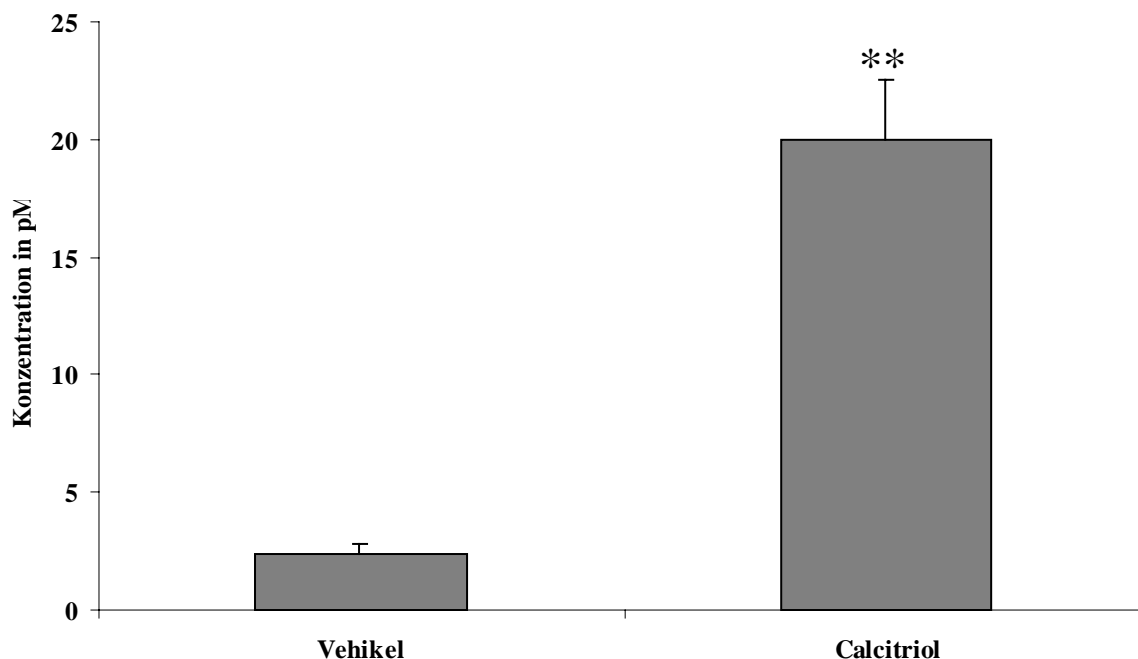


Abb. 23: Messung der nach 1 Tag aus Adipozyten freigesetzten Calcitriolkonzentration mittels Transaktivierungsassay. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve von der gemessenen Luziferaseaktivität ermittelt. Es wurden substantielle Mengen des biologisch aktiven Hormons freigesetzt.

** $p < 0,001$

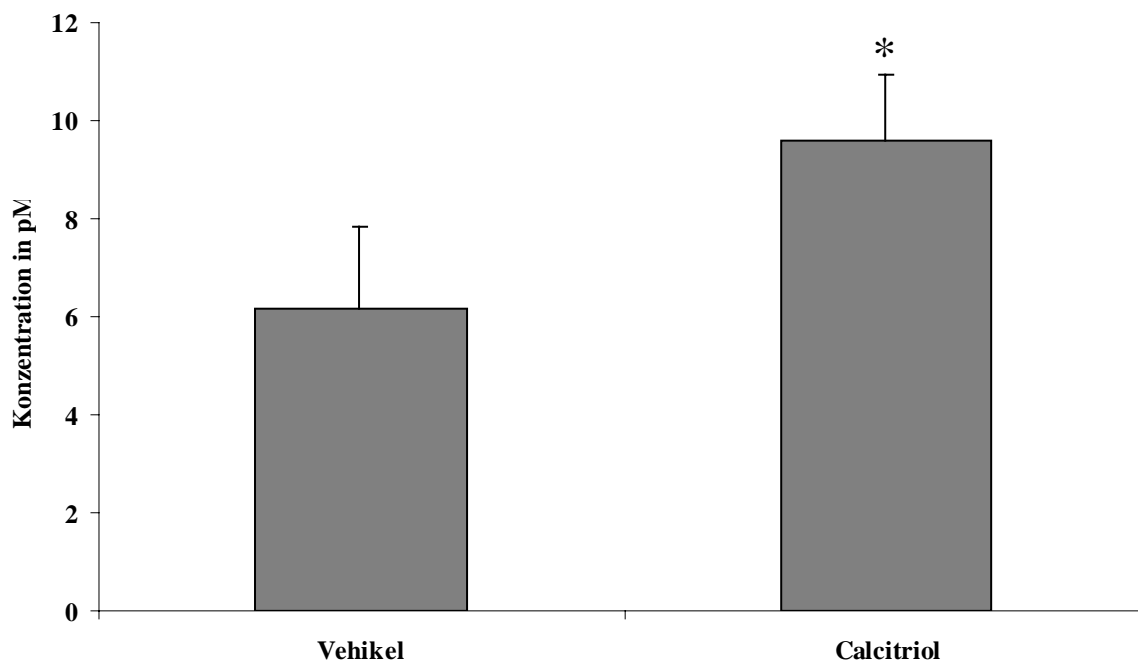


Abb. 24: Messung der nach 3 Tagen aus Adipozyten freigesetzten Calcitriolkonzentration mittels Transaktivierungsassay. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve von der gemessenen Luziferaseaktivität ermittelt. Es wurde auch nach 3 Tagen noch Calcitriol aus den Adipozyten freigesetzt, jedoch in niedrigerer Konzentration. * $p < 0,05$

4.12. Freisetzung des Calcitriols aus Adipozyten in Abhängigkeit von verschiedenen Substanzen

Nachdem die Freisetzung der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga in Abhängigkeit von der Zeit eindeutig nachgewiesen wurde, war die Frage von Bedeutung ob andere Hormone oder Pharmaka Einfluss auf die Freisetzung der Vitamin D₃ Analoga haben.

Zunächst wurden die Adipozyten über 3 Tage mit 100 nM unmarkiertem Calcitriol inkubiert und im Anschluß für weitere 24 Stunden mit dem zu testenden Hormon bzw. Pharmakon oder Vehikel (Ethanol) inkubiert. Die quantitative Auswertung der freigesetzten Calcitriolmengen erfolgte erneut mittels Transaktivierungsassay wie unter 2.8. beschrieben.

In die Untersuchung einbezogen wurden die folgenden Substanzen: Isoproteranol, Leptin, Melatonin, Arterenol, Luteotropes Hormon (LTH) sowie Parathyreoidhormon (PTH). Bis auf die beiden zuletzt genannten Hormone LTH und PTH zeigte sich kein Effekt der untersuchten Substanzen in Bezug auf eine vermehrte Freisetzung des Calcitriols aus den Adipozyten (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildungen 25 und 26 stellen die gesteigerte Freisetzung des gespeicherten Calcitriols durch Einwirkung des LTH bzw. des PTH dar. Im Vergleich dazu ist die Freisetzung des Calcitriols aus Adipozyten gezeigt, die lediglich mit Vehikel behandelt wurden. Das LTH war in einer Konzentration von 10^{-7} M in der Lage, die Calcitriolfreisetzung um das 6,9fache zu steigern, während PTH in einer Konzentration von 10^{-7} M lediglich eine Erhöhung der Freisetzung auf die doppelte Menge erreichte.

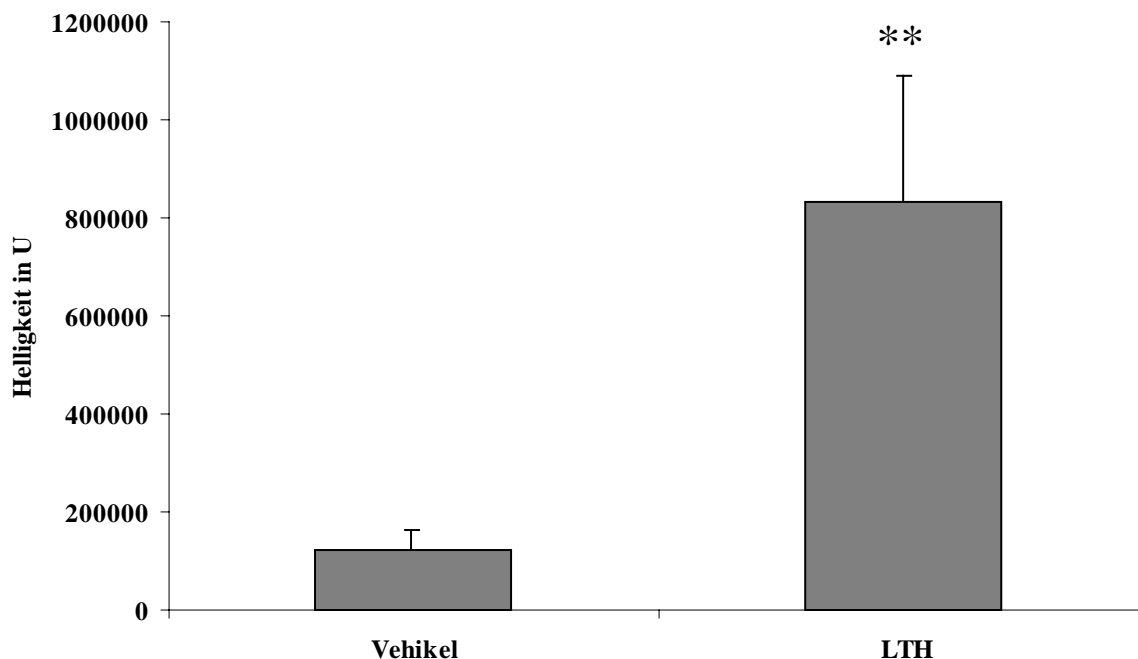


Abb. 25: Messung der aus Adipozyten freigesetzten Calcitriolkonzentration in Abhängigkeit von LTH mittels Transaktivierungsassay. Im Gegensatz zu den Adipozyten, die mit Vehikel (Ethanol) behandelt wurden, setzten Adipozyten unter dem Einfluss von LTH signifikant (6,9 fach) mehr gespeichertes Calcitriol frei.

** $p < 0,001$

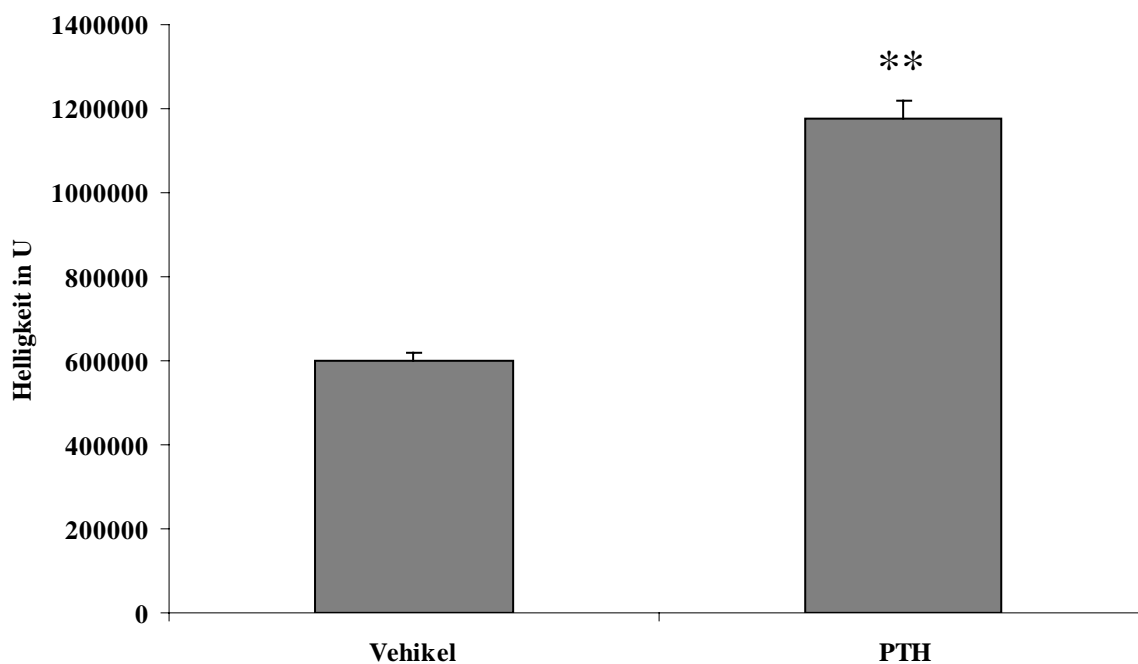


Abb. 26: Messung der aus Adipozyten freigesetzten Calcitriolkonzentration in Abhängigkeit von PTH mittels Transaktivierungsassay. Im Gegensatz zu den Adipozyten, die mit Vehikel (Ethanol) behandelt wurden, setzten Adipozyten unter dem Einfluss von PTH signifikant (2 fach) mehr gespeichertes Calcitriol frei.

** $p < 0,001$

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Aufnahme, Speicherung und Freisetzung sowie das Echtzeitmonitoring des intrazellulären Transportes von fluoreszierenden Vitamin D₃ Analoga in Adipozytenzellkulturen.

Die Aufnahme und Speicherung der intakten fluoreszierenden Vitamin D₃ Analoga in Adipozyten wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie, Spektrofluorometrie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie nachgewiesen. Intrazellulär reichert sich alle Analoga in den Fettvakuolen der Adipozyten an. Dieser Prozess war spezifisch für die einzelnen Metaboliten, da er sich sowohl im Zeitraum und der Aufnahmegeschwindigkeit als auch in der Intensität unterschied. Zudem wurde der BODIPY-Marker ohne Vitamin D₃ Komponente nur sehr spärlich in das Zytoplasma aufgenommen und nicht in den Fettvakuolen gespeichert. Der Aufnahmeprozess fluoreszierender Vitamin D₃ Analoga war von Temperatur, Energie und Calciumkonzentration abhängig. Dabei zeigte die Aufnahme von BODIPY-Calcitriol eine spezifische Sättigungskinetik und war kompetitiv hemmbar.

Fluoreszierende Vitamin D₃ Analoga wurden aus dem Fettgewebe nur sehr langsam freigesetzt, standen aber dann dem Vitamin D₃ Stoffwechsel sofort zur Verfügung. Calcitriol wurde als biologisch aktiver Metabolit in den Adipozyten gespeichert und war nach seiner Freisetzung in der Lage, die Transkription Vitamin D₃ abhängiger Gene zu induzieren. Die Hormone Prolaktin und PTH forcierten die Freisetzung von Calcitriol.

5.1. Aufnahme von intakten und biologisch aktiven Vitamin D₃ Analoga

Der Mechanismus der Speicherung von Vitamin D₃ und seinen Metaboliten ist ein wenig beforschtes Gebiet. Bisherige Studien wurden zum größten Teil mit radioaktiv markierten Vitamin D₃ Analoga (Rosenstreich et al. 1971) oder in nativer Form im Tiermodell (Hidiroglou und Williams 1984, Brouwer et al. 1998) durchgeführt. Die Nachteile in der Verwendung radioaktiver Liganden konnten durch den Einsatz fluoreszierender Analoga mit den Vorteilen einer sicheren und einfachen Anwendung umgangen werden. Außerdem ist neben Aussagen zur Aufnahme und Speicherung auch eine Beurteilung des intrazellulären Transports möglich.

Unter Verwendung von BODIPY®581/591 wurden rot fluoreszierende Vitamin D₃ Analoga hergestellt. BODIPY ist ein fluoreszierender Marker und besonders zur Markierung von Hormonen geeignet. Die guten physikalischen Eigenschaften wie die relativ geringe Größe, eine hohe Quantenausbeute und eine schmale Emissionsbandbreite bei geringer Beeinflussung der Hormonfunktion zeichnen diesen Marker aus. Außerdem wurde er bereits erfolgreich verwendet, um Vitamin D₃ (Barsony et al. 1995) und andere Liganden wie Dopamin (Barton et al. 1991) und Estradiol (French et al. 1993) zu markieren. BODIPY®581/591 wurde in der 3β-Position des A-Ringes durch eine Esterbrücke mit den Vitamin D₃ Metaboliten verbunden. Diese Esterbindung war stabil gegenüber endogenen Esterasen der Adipozyten. Die BODIPY-Vitamin D₃ Analoga wurden als intakte fluoreszierende Metabolite in den Zellen gespeichert. Die Spezifität des Aufnahmeprozesses der BODIPY-Vitamin D₃ Analoga in die Lipidtropfen war auf die Vitamin D₃ Komponente zurückzuführen, da der BODIPY-Marker allein nur in geringem Ausmaß in die Zellen aufgenommen und nicht in den Fettvakuolen gespeichert wurde. Um die Speicherung der Vitamin D₃ Analoga unter möglichst physiologischen Bedingungen zu testen, ist es wichtig, dass sie biologisch wirksam sind. BODIPY-Calcitriol war in der Lage, die Gentranskription in ähnlichem Maße zu aktivieren wie unmarkiertes Calcitriol. Mit der Aktivierung der Gentranskription ist auch eine hohe Affinität zum VDR verbunden, da erst durch Bindung des Liganden die Transkriptionsrate ansteigt (Carlsberg and Saurat 1996). Barsony et al. (1995) zeigten, dass mit BODIPY540 markiertes Calcitriol eine hohe Affinität zum VDR mit biologischer Aktivität und eine gegenüber Esterasen stabile Esterbindung besaß. Zusätzlich konnten sie nachweisen, dass die Analoga neben VDR auch eine dem unmarkierten Calcitriol entsprechende Affinität zu DBP haben. Die Aufnahme von BODIPY-Calcitriol in Fibroblasten war bei Barsony et al. vergleichbar mit der des [³H]-Calcitriols. Da sich der rot fluoreszierende BODIPY-Marker nur wenig vom grün fluoreszierenden unterscheidet, kann man davon ausgehen, dass diese Ergebnisse auch auf die von uns genutzten Vitamin D₃ Analoga übertragbar sind. Somit bieten sie hervorragende Voraussetzungen für die Untersuchung sowie das Echtzeitmonitoring der Aufnahme und Speicherung in Adipozyten.

5.2. Zeitverlauf und intrazelluläre Verteilung der Vitamin D₃ Analoga

Das Fettgewebe ist ein Depot zur Speicherung und Freisetzung von Vitamin D₃. Wie schon aus anderen Studien bekannt (Rosenstreich et al. 1971; Mawer et al. 1972), werden Calciferol und Calcidiol in Adipozyten aufgenommen und gespeichert. Bisher war jedoch unklar, ob neben diesen Metaboliten auch das aktive Calcitriol im Fettgewebe gespeichert wird. Studien von Rungby et al. (1993) an Schweinen legten die Möglichkeit einer Speicherung von Calcitriol nahe. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass in den Adipozyten nachgewiesenes Calcitriol nicht intrazellulär aus der Vorstufe 25-Hydroxycholecalciferol hydroxyliert wurde. In dieser Studie konnten wir erstmals zeigen, dass Calcitriol in die Adipozyten aufgenommen und in unveränderter Form gespeichert wird.

Die qualitative und quantitative Auswertung der Aufnahme der einzelnen Vitamin D₃ Analoga zeigte analogaspezifische Unterschiede, vor allem im Zeitverlauf und in der intrazellulären Verteilung. Diese Unterschiede stehen möglicherweise im Zusammenhang mit differenten Aufnahme- und Transportsystemen für die einzelnen Analoga. Der von uns gefundene Zeitverlauf der Aufnahme von BODIPY-Calciferol bestätigte die Ergebnisse von Rosenstreich et al. (1971). Hingegen lassen sich in der Literatur keinerlei Aussagen zum Zeitverlauf der anderen Vitamin D₃ Metaboliten finden.

Während BODIPY-Calcitriol und BODIPY-Calcidiol bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in einer signifikanten Konzentration in den Lipidtropfen gespeichert wurden, war BODIPY-Calciferol erst relativ spät in diesen nachweisbar. Zusätzlich war BODIPY-Calciferol auch sehr ausgeprägt in cytoplasmatischen Spots nachzuweisen, bei denen es sich um Mitochondrien oder den Golgi-Apparat handeln könnte. In Fibroblasten konnte eine Kollokalisierung von BODIPY-Calcitriol mit diesen Organellen nachgewiesen werden (Barsony et al. 1996). Es bleibt jedoch unklar, welche Bedeutung dieser Lokalisation von Vitamin D₃ in Mitochondrien zuzumessen ist. Es könnte spekuliert werden, dass Cholecalciferol dort wie auch in der Leber von dem mitochondrialen Enzym CYP27 hydroxyliert wird (Okuda et al. 1995). Auch schon Rosenstreich et al. (1971) sahen es als wahrscheinlich an, dass gespeichertes Cholecalciferol als Quelle zur Bildung polarer Metabolite sowohl im Blut als auch im Fettgewebe dient.

Aber nicht nur BODIPY-Calciferol, sondern auch BODIPY-Calcitriol zeichnete sich durch eine besondere subzelluläre Verteilung aus. BODIPY-Calcitriol war nicht nur in den Lipidtropfen detektierbar, sondern zeigte zusätzlich eine gleichmäßige zytoplasmatische

Fluoreszenz. Barsony et al. (1996) fanden dieses zytoplasmatische Verteilungsmuster ebenfalls in Fibroblasten vor. Es ist auf die hochaffine Bindung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an den VDR zurückzuführen und entspricht der Verteilung des Rezeptors. Die gleiche Arbeitsgruppe wies auch einen signifikanten, aber kleineren Anteil der Fluoreszenz nukleär nach, der in den Adipozyten fehlte. Dies könnte durch ein Fehlen des VDR in den Fettzellen möglich sein. Die zytoplasmatische Verteilung und der Nachweis genomischer Wirkungen im Fettgewebe (Shi et al. 2002, Querfeld et al. 1999) sprechen jedoch für das Vorhandensein von VDR in Adipozyten. Wahrscheinlicher ist, dass wir durch das Überexponieren der Zellen mit 100 nM BODIPY-Calcitriol ein sehr ausgeprägtes Signal der Fettvakuolen erzeugten, welches uns nicht mehr gestattete, die nukleäre Fluoreszenz mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nachzuweisen. Die Wahl dieser Konzentration für die Aufnahmestudien begründete sich in der vergleichbaren Aktivität des BODIPY-Calcitriols und des nativen Calcitriols bei 100 nM sowie der guten Detektierbarkeit in der Spektrofluorometrie.

So unterschiedlich sich die einzelnen Analoga schon in der subzellulären Verteilung dargestellt hatten, so unterschiedlich war auch die quantitative Auswertung der Aufnahme und Speicherung. BODIPY-Calcitriol wurde in weitaus höheren Konzentrationen gespeichert als die anderen fluoreszierenden Vitamin D_3 Analoga. Auch Runghy et al. (1993) fanden relativ hohe Konzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Fettgewebe von Schweinen, welche die Plasmaspiegel um das 3 bis 7-fache überstiegen. Da jedoch unter physiologischen Bedingungen die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Konzentration im Organismus streng reguliert ist und sich im pmol-Bereich bewegt, ist auch die absolute Konzentration von Calcitriol in vivo im Fettgewebe geringer als die von Cholecalciferol oder 25-Hydroxycholecalciferol. Erstaunlicherweise trat im Gegensatz zum BODIPY-Calcitriol sowohl beim BODIPY-Calciferol als auch beim BODIPY-Calcidiol eine Sättigung der Adipozyten auf. In den bisher durchgeführten Tierstudien, in denen die Nahrung mit Vitamin D_3 supplementiert wurde (Rosenstreich et al. 1971, Brouwer et al. 1997), nahm über den gesamten Zeitraum der Supplementierung die Konzentration dieser beiden Metabolite zu, ohne dass eine Sättigung festgestellt werden konnte. Allerdings liegen keine Ergebnisse von in vitro Studien vor. So ist es denkbar, dass im Tiermodell im Gegensatz zum Kulturmodell die Konzentrationen, die zur Sättigung des Fettgewebes geführt hätten, nicht erreicht wurden. Zudem ist diese Problematik in der Literatur kontrovers diskutiert worden. Lawson et al. (1986) beschrieben z.B. eine Sättigung des Fettgewebes mit Cholecalciferol. Allerdings wurden in dieser Studie die Ratten

nicht mit Vitamin D₃ supplementiert, sondern die Haut der Tiere mit UV-Licht zur Vitamin D₃ Produktion angeregt.

5.3. Aufnahmemechanismus

Der unterschiedliche Zeitverlauf der Aufnahme und Speicherung der einzelnen Analoga lässt unterschiedliche Aufnahmemechanismen durch die Plasmamembran und in die Lipidvakuolen vermuten. Bislang galt jedoch die Meinung, dass die Translokation des Vitamin D₃ und seiner Metaboliten durch die Plasmamembran der Zielzellen von dem nicht an DBP-gebundenen Anteil abhängig ist und einen einfachen Diffusionsprozess darstellt. Diese Annahme basiert auf dem Fakt, dass Vitamin D₃ einen sehr lipophilen Charakter besitzt und deshalb sehr einfach durch die Lipiddoppelschicht der Plasmamembranen diffundieren könnte. Vitamin D₃-bindende Proteine wie DBP hätten somit eine regulierende Funktion, indem sie die Menge des freien, zur Diffusion befähigten Hormonanteils, bestimmten (Bikle et al. 1989, Mendel et al. 1989).

Die Ergebnisse neuerer Studien mit Megalin knock-out Mäusen (Nykjaer et al. 1999) und unserer Arbeit sprechen allerdings gegen dieses Modell und messen DBP eine weitaus größere Bedeutung im Vitamin D₃ Haushalt zu als bisher angenommen. Der transmembrane Transport von BODIPY-Calcitriol zeigte sowohl eine Energie- und Temperaturabhängigkeit als auch eine Sättigungskinetik. Außerdem bestand eine kompetitive Hemmung zwischen BODIPY-Calcitriol und nativem Calcitriol für die Aufnahme in die Zellen. Diese Beobachtung wurde auch durch Barsony et al. (1995) mit Fibroblasten gemacht. Zusammen mit der Aufnahmespezifität für die verschiedenen Vitamin D₃ Analoga sprechen diese Ergebnisse für einen Carrier-vermittelten Transport der Hormone durch die Plasmamembran.

Die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T₃) und Tetrajodthyronin (T₄) haben wie Vitamin D₃ ebenfalls einen lipophilen Charakter und müssen die Plasmamembran ihrer Zielzellen durchdringen, um mit dem Thyroidrezeptor (TR) interagieren zu können. Der TR gehört wie der VDR zur Klasse II der nukleären Rezeptoren (Apriletti et al. 1998). Für T₃ und T₄ existierte auch Jahrzehnte die Theorie, nach welcher die Hormone durch einfache Diffusion den Intrazellulärraum erreichen. Frühe Studien fanden weder Temperatur- und Energieabhängigkeit noch eine Sättigung der Aufnahme (Tata 1964, Hillier 1968). Erst seit den siebziger Jahren wurden in zunehmenden Maße Carrier-vermittelte

Aufnahmemechanismen in einer Vielzahl von Zellarten entdeckt (Rao et al. 1976, Holm et al. 1979, Zonefrati et al. 1983). Heute gibt es kaum noch Zweifel daran, dass diese Hormone durch Plasmamembrancarrier in die Zellen gelangen (Hennemann et al. 2001). In Hepatozyten wurden sowohl für T_3 als auch für T_4 zwei unterschiedliche Aufnahmeprozesse mit Sättigungskinetik beschrieben. Dabei zeigte einer der Prozesse eine hohe Affinität bei geringer Kapazität und der andere Prozess eine geringe Affinität bei hoher Kapazität (de Yong et al. 1993, Riley et al. 1993). Das hochaffine System, dessen Michaelis-Menten-Konstante im Nanomolarbereich lag, repräsentiert den Translokationsmechanismus der Schilddrüsenhormone durch die Plasmamembran und zeigt eine Energie- und Temperaturabhängigkeit. Der niederaffine Aufnahmemechanismus ist dagegen energie- und temperaturunabhängig, seine Michaelis-Menten-Konstante liegt ca. 2 Größenordnungen über der des hochaffinen Systems, und er stellt wahrscheinlich eine Bindung der Hormone an Oberflächenproteine der Membran dar (Krenning et al. 1979). Da jedoch T_3 und T_4 im Blutserum nur im Pikomolarbereich vorhanden sind, spielt unter physiologischen Bedingungen dieses System keine Rolle.

Auch für Glukokortikoide, die ebenfalls über einen intrazellulären Hormonrezeptor ihre Wirkungen entfalten, konnten 2 Systeme mit Sättigungskinetik nachgewiesen werden (Rao et al. 1976). Obwohl für diese Hormone ebenfalls eine carrier-vermittelte Aufnahme in die Zellen umstritten ist, deuten doch neuere Studien auf einen solchen Mechanismus für Cortikosteron in Hepatozyten hin (Lackner et al. 1998).

Es erscheint demnach nicht abwegig, dass auch Vitamin D_3 durch einen carrier-medierten Mechanismus in die Zellen internalisiert wird. Für $25(OH)D_3$ wurde bereits eine rezeptorvermittelte Aufnahme in die proximalen Tubuluszellen der Niere nachgewiesen (Nykjaer et al. 1999). Allerdings wird $25(OH)D_3$ im Gegensatz zu T_3 und T_4 gemeinsam mit seinem Bindungsprotein DBP und dem Membranrezeptor durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. Bisher sind 2 Rezeptoren für den $25(OH)D_3$ /DBP-Komplex bekannt. Der Megalinrezeptor, ein 600 kDa Transmembranprotein, ist ein Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie. Er wird stark an der luminalen Zellmembran der Tubuluszellen exprimiert und ist an der Rückresorption von Liganden aus dem Glomerulumfiltrat beteiligt (Christensen et al. 1999). Die Abwesenheit des Rezeptors führt zum Verlust von $25(OH)D_3$ über den Urin und somit zur Vitamin D_3 Defizienz. Ein zweiter Rezeptor für den $25(OH)D_3$ /DBP-Komplex ist der 460 kDa Cubilinrezeptor, der identisch mit dem intrinsic factor/Vitamin B_{12} -Rezeptor ist (Moestrup and Verroust 2001). Da der Rezeptor jedoch keine transmembrane, für die Endozytose wichtige Domäne besitzt, interagiert er mit dem Megalin-Rezeptor. Im Modell

der Megalin knock-out Maus konnte jedoch trotz der fehlenden Internalisierung des 25(OH)D₃ eine geringe Menge an 1,25(OH)₂D₃ in den Nieren produziert werden. Dies lässt die Möglichkeit alternativer Wege zur Aufnahme von Vitamin D₃, wie beispielsweise die passive Diffusion, offen und erklärt die in dieser Arbeit dargestellte inkomplette Hemmung der BODIPY-Calcitriol Aufnahme durch Natriumazid.

Vergleichbare Aufnahmemechanismen rezeptorvermittelter Endozytose wurden für Testosteron in den Epididymis (Hilpert et al. 2001) und für 17β-Östradiol in das Endometrium (Noe et al. 1992) beschrieben. Da der Megalinrezeptor zur Gruppe der LDL-Rezeptorfamilie gehört, zeigt auch sein endozytotischer Mechanismus bemerkenswerte Ähnlichkeiten mit der zellulären Aufnahme von lipoproteingebundenem Cholesterol durch den Lipoproteinrezeptor. Nach erfolgter Endozytose des 25(OH)D₃/DBP-Komplexes zusammen mit dem Megalin/Cubilin-Rezeptor werden die Carrier in den Lysosomen degradiert, und das 25(OH)D₃ steht zur weiteren Hydroxylierung bereit. Die intrazellulären Transportmechanismen der Vitamin D₃ Metaboliten sind im Einzelnen ungeklärt. Da Vitamin D₃ und seine Metabolite eine geringe Löslichkeit aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass auch intrazelluläre Transportproteine existieren. Solche Proteine wurden bereits für Vitamin A (Napoli 1996) und Vitamin E (Ouahchi et al. 1995) identifiziert. In neueren Studien von Wu et al. (2000) konnten intrazelluläre Vitamin D₃ Bindungsproteine (IDBP-1 und-2) nachgewiesen werden, welche möglicherweise eine solche Transportfunktion für Vitamin D₃ und seine Metaboliten in der Zelle übernehmen. Diese Shuttleproteine gehören in die Gruppe der Hitzeschockproteine 70 und sind in der Lage mit Megalin und Hydroxylasen zu interagieren, so dass eine Übertragung der Vitamin D₃ Metaboliten vom Megalinrezeptor über die IDBP zu Zielstrukturen möglich erscheint. Zudem besteht eine zunehmende Rezeptoraffinität für die Vitamin D₃ Metaboliten vom Megalinrezeptor über die IDBP bis hin zum VDR (Gacad und Adams 1998, Jones et al. 1998). Ein solches Modell der rezeptorvermittelten Endozytose und anschließender Bindung der Hormone an intrazelluläre Shuttle ist auch für Adipozyten denkbar und bietet einen Ansatzpunkt zur Erklärung der unterschiedlichen intrazellulären Verteilung der BODIPY-markierten Vitamin D₃ Analoga. Während BODIPY-Calcidiol wahrscheinlich durch IDBP relativ schnell zu den Lipidtropfen transportiert wird und dadurch seinem Nachweis im Zytoplasma entgeht, wird ein Teil des IDBP gebundenen BODIPY-Calcitriols vor der Speicherung zum gleichmäßig verteilten zytoplasmatischen VDR transferiert, um als Hormon-Rezeptor-Komplex biologisch aktiv zu werden. Demzufolge erscheint es als gleichmäßige zytoplasmatische Färbung neben den dominanten Lipidtropfen.

Auch wenn es die detaillierten Schritte der Aufnahmemechanismen für die einzelnen Vitamin D₃ Analoga noch zu klären gilt, so ist doch sicher, dass die unterschiedlichen qualitativen und quantitativen Modalitäten der Aufnahme und Speicherung der Analoga eine einfache Aufnahme durch Diffusion unwahrscheinlich machen und DBP eine zentrale Rolle in diesem System spielt. Aber vielleicht hat DBP nicht nur einen Einfluss auf die rezeptor-medierte Aufnahme des Vitamin D₃, sondern stellt auch das Bindeglied in Bezug auf die nichtgenomischen Wirkungen des 1,25(OH)₂D₃ dar. Diese nichtgenomischen Effekte werden wahrscheinlich durch einen Rezeptor vermittelt, der sich vom nukleären VDR unterscheidet und von dem vermutet wird, dass es sich um einen Membranrezeptor handelt. Megalin und Cubilin stellen bereits zwei gut etablierte Rezeptoren der Plasmamembran dar, an die der 25(OH)D₃/DBP-Komplex bindet. Es ist also durchaus denkbar, dass weitere Membranrezeptoren gefunden werden, die diesen Komplex binden können. Deren Funktion aber nicht die Internalisierung des Vitamin D₃ ist, sondern die über ein rezeptorgekoppeltes G-Protein die intrazelluläre Konzentration von Inositoltriphosphat und Diacylglycerin und somit konsekutiv auch die Konzentration von intrazellulärem Kalzium und Proteinkinase C steigern. Dieser Mechanismus stellt ein neues Vitamin D₃-Signal-System dar, welches sich von den klassischen intrazellulären Steroidrezeptoren unterscheidet.

Ein ähnliches Second-Messenger-System wurde bereits für andere Steroide wie beispielsweise Östrogene und Androgene nachgewiesen (Rosner et al. 1999, Kahn et al. 2002). Sex hormone binding globulin (SHBG) ist ein Plasmaprotein, welches Sexhormone mit großer Affinität bindet und diese Hormone im Blut transportiert. In den letzten Jahren wurde jedoch gezeigt, dass SHBG nicht nur für die Regulation des freien Hormonteils wichtig ist, sondern eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Sexhormone spielt, ohne dass diese die Zellmembran passieren. SHBG bindet an einen Membranrezeptor, der offenbar ein Molekulargewicht von 150 kDa besitzt und G-Protein assoziiert ist.

Auch für Vitamin D₃ gibt es eindeutige Hinweise auf einen solchen G-Protein assoziierten Membranrezeptor. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits nachgewiesen, dass 1,25(OH)₂D₃ innerhalb von Minuten eine Änderung im Phosphoinositolmetabolismus (Bourdeau et al. 1990; Morelli et al. 1993), eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (Lieberherr et al. 1987; Sugimoto et al. 1988) sowie die Aktivierung der Proteinkinase C (Sylvia et al. 1996) bewirkt. Der Vitamin D₃-Membranrezeptor wurde jedoch bislang nicht eindeutig identifiziert. Es bleibt also zu spekulieren, dass dieser Rezeptor möglicherweise in der Lage ist, DBP zu binden.

5.4. Einfluss der aus Adipozyten freigesetzten Vitamin D₃ Analoga auf den Vitamin D₃ Haushalt

Ebenso wie die Aufnahme der Vitamin D₃ Hormone ins Fettgewebe einem regulierten Mechanismus unterliegt, ist auch die Regulation der Freisetzung der Hormone aus dem Fettgewebe wahrscheinlich. Das Fettgewebe akkumuliert Vitamin D₃ Analoga schnell, setzt sie jedoch nur langsam wieder frei (Brouwer et al. 1998). Wegen dieser Eigenschaften wurde das Fettgewebe bisher als Puffer- und Depotsystem zur Speicherung von Vitamin D₃ und 25-Hydroxyvitamin D₃ angesehen, um die Plasmaspiegel dieser Hormone in einem gewissen Rahmen zu halten. In der Adipozytenkultur konnten wir ebenfalls eine langsame Freisetzung von BODIPY-Calciferol zeigen. Sieben Tage nach Beendigung der Hormonzufuhr waren ca. 40% des gespeicherten BODIPY-Calciferols aus den Zellen freigesetzt, welches dann in vivo zur weiteren Hydroxylierung und Bildung des aktiven Metaboliten zur Verfügung stehen würde. Daneben haben wir erstmals die Speicherung und Freisetzung von aktivem 1,25(OH)₂D₃ nachgewiesen, welches zur direkten Interaktion mit dem VDR in Zielzellen und somit zur Gentranskription befähigt ist. Die Halbwertszeit des gespeicherten BODIPY-Calcitriols war mit 7 Tagen jedoch etwas kürzer als die des BODIPY-Calciferols. Aufgrund der biologischen Aktivität des freigesetzten Calcitriols und der Tatsache, dass sich diese Freisetzung durch verschiedene Hormone regulieren ließ, wird die alleinige passive Rolle des Fettgewebes als einfaches Depot in Frage gestellt. Vielmehr repräsentiert es einen wichtigen Faktor im straff regulierten Regime des endokrinen Systems des Vitamin D₃. Neben lipolysesteigernden Hormonen wurden auch Prolaktin (LTH) sowie den Vitamin D₃ Haushalt regulierende Hormone wie PTH getestet. PTH und Prolaktin waren in der Lage, die Freisetzung von BODIPY-Calcitriol um das Doppelte bzw. das knapp Siebenfache zu forcieren. Es ist bekannt, dass PTH die Bildung des 1,25(OH)₂D₃ durch Aktivierung der 1 α -Hydroxylase fördert (Garabedian et al. 1972; Fraser et al. 1973) und beide Hormone durch ihre renale und ossäre Wirkung gemeinsam die Plasmakalziumspiegel erhöhen. Mit dieser bekannten regulierenden Funktion des PTH ist auch dieses Ergebnis konform, welches für PTH ebenfalls eine aktive Rolle bei der Freisetzung des Calcitriols aus den Adipozyten zeigt und somit einmal mehr in das komplexe System des Vitamin D₃ Haushalts eingreift. Im Falle einer Hypokalzämie kann somit ohne Zeitverlust 1,25(OH)₂D₃ aus dem Fettgewebe mobilisiert werden, während gleichzeitig für den weiteren Bedarf 1,25(OH)₂D₃ in der Niere aus 25(OH)D₃ gebildet wird.

Für Prolaktin stellt sich allerdings der Zusammenhang zwischen der regulierenden Funktion auf die Hormonfreisetzung und den Vitamin D₃ Haushalt nicht so offensichtlich dar. Prolaktin

ist ein wichtiges Hormon für die Steuerung der Reproduktionsorgane. Syntheseort sind die mammotropen Zellen der Adenohypophyse. Neben seiner Beteiligung an der Steuerung der Pubertät und des Ovulationzyklus bewirkt Prolaktin beim Menschen vor allem an der Brustdrüse eine Proliferationssteigerung der Milchgänge sowie die Stimulation der Laktation (Clevenger und Plank 1997). Aufgrund dessen lassen sich ein deutlicher Anstieg der Hormonsekretion zum Ende der Schwangerschaft und erhöhte Spiegel während der Stillperiode registrieren (Tsutsui und Stabenfeldt 1993). Besonders der Saugreiz des Kindes an der Brustwarze führt zur Ausschüttung von Prolaktin (McNeilly et al. 1983). Durch die Supplementierung von Neugeborenen und Säuglingen mit Vitamin D₃ zum Schutz vor Rachitis ist unser Blick für den natürlichen Mechanismus getrübt worden. Denn auch ohne Vitamin D₃ Prophylaxe erhalten gestillte Säuglinge einen adäquaten Vorrat an Vitamin D₃. Versuche von Clements und Fraser (1988) haben gezeigt, dass die Feten bereits im letzten Drittel der Gestation transplazentär mit Vitamin D₃ versorgt werden und dieses im Muskelgewebe gespeichert wird. Zusätzlich können aber auch Vitamin D₃ sowie seine Metaboliten, einschließlich des aktiven Calcitriols, in der Muttermilch nachgewiesen werden (Hollis et al. 1981). Somit erhält der Säugling mit jeder Nahrungsaufnahme einen weiteren „Vitaminstoß“. Die Menge der Vitamin D₃ Metaboliten in der Muttermilch ließ sich durch orale Zufuhr des Vitamins durch die Mutter verstärken. Zusammenfassend betrachtet zeigt sich eine bisher noch nicht bekannte Wirkung des Prolaktins auf den Vitamin D₃ Status des Feten bzw. des Neugeborenen. Durch die Steigerung der Prolaktinspiegel während des letzten Trimenons bzw. der Laktationsperiode werden Vitamin D₃ und seine Metaboliten aus dem Fettgewebe freigesetzt, um transplazentär bzw. via Muttermilch den Vitamin D₃ Vorrat der Nachkommen zu sichern. Da dieser Mechanismus jedoch stark vom Vitamin D₃ Status der Mutter abhängt und eine ausreichende Versorgung der Nachkommen nur unter optimalen Bedingungen gewährleistet ist, sollte auf die Vitamin D₃ Prophylaxe der Neugeborenen dennoch nicht verzichtet werden.

Von großem Interesse ist auch die Frage nach den gespeicherten Vitamin D₃ Vorräten während Zeiten negativer Energiebilanz und Abbau des Fettgewebes. In Studien konnten keine signifikanten Unterschiede der Plasmakonzentrationen von Cholecalciferol und Calcitriol in fastenden Organismen detektiert werden (Asch und Asch 1994, Brouwer et al. 1998). Die Konzentration des Cholecalciferols im Fettgewebe stieg sogar an, da die Tiere im Vergleich mehr Triacylglycerin als Vitamin D₃ verloren. Diskrepanzen gibt es allerdings bei 25-Hydroxycholecalciferol. Während Asch und Asch (1994) auch hier keine signifikanten Unterschiede feststellen, zeigten Brouwer et al. (1998) eine ca. 20%ige Zunahme der Plasmakonzentration. Während des Fastens wird die Energiebereitstellung des Körpers

hauptsächlich durch die Freisetzung der gespeicherten Triacylglycerine gewährleistet. Vor allem der Abfall des Insulins und die Zunahme des Glukagons führen in dieser Situation zur Lipolyse (Jensen et al. 1987, Harmon and Sheridan 1992). Aber auch Adrenalin und Noradrenalin führen zur Lipolyse und beeinflussen die Triacylglycerinfreisetzung während des Fastens (Chideckel et al. 1977; Steiner et al. 1985). Bei den von uns durchgeführten Freisetzungsstudien mit Noradrenalin (Arterenol) und Isoproteranol (Isoprenalin) konnten wir keine verstärkte Mobilisierung von Vitamin D₃ und seinen Metaboliten aus dem Fettgewebe feststellen. Zudem erscheinen diese Mechanismen auch insofern als sinnvoll, als dass der Körper im Falle des Fastens neben der Aufrechterhaltung des Substratangebotes zusätzlich mit einer eventuellen Vitamin D₃ Intoxikation gestresst wäre. Neben diesen Hormonen wurden auch der Einfluss von Melatonin und Leptin auf die Mobilisierung der Vitamin D₃ Analoga aus den Adipozyten untersucht. Melatonin wird im Corpus pineale produziert und seine Ausschüttung durch den Tag-Nacht-Rhythmus beeinflusst (Geoffriau et al. 1998). Neben dem Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus spielt Melatonin bei Säugetieren auch im Zusammenhang mit der Reproduktion eine wichtige Rolle (Reiter 1998). Da Vitamin D₃ in einer lichtabhängigen Reaktion in der Haut gebildet wird, sollte getestet werden, ob Melatonin während der Dunkelperioden in der Lage wäre, den Körper mit Vitamin D₃ durch Freisetzung aus dem Fettgewebe zu versorgen. Aber auch Melatonin führte zu keiner Veränderung in der BODIPY-Calcitriol-Freisetzung. Leptin ist ein Protein, das in engem Zusammenhang mit der Adipositas steht. In Mäusen mit extremer Fettsucht wurde ein Defekt des Leptin-kodierenden ob-Gens identifiziert (Szymczak und Laskowska-Klita, 2001). Die Injektion von Leptin in Mäuse mit der homozygoten ob-Mutation normalisiert sämtliche Symptome des Gendefekts, während die Verabreichung an normale Mäuse zu deren Abmagerung führt. Da Leptin in der Lage scheint, die Körperreserven zu mobilisieren und in engem Zusammenhang mit dem Fettgewebe steht, wurde auch diese Substanz getestet. Aber ebenso wie bei Noradrenalin und Isoproteranol zeigte sich auch bei Leptin kein Effekt auf die Mobilisierung von Vitamin D₃ aus den Adipozyten.

5.5. Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme, Speicherung und Freisetzung von fluoreszierenden Vitamin D₃ Analoga näher charakterisiert. Dabei machten wir uns das Adipozytenkultursystem der 3T3-L1 Zellen zu nutze und etablierten es als ein einfach zu handhabendes und gut reproduzierbares Modellsystem zur Messung von intrazellulären Hormonkonzentrationen und zum mikroskopischen Echtzeitmonitoring des intrazellulären Transports der einzelnen Vitamin D₃ Metaboliten. So konnten wir auch erstmals nachweisen, dass neben Cholecalciferol und Calcidiol auch der biologisch aktive Metabolit Calcitriol in den Adipozyten angereichert und gespeichert wird und dem Vitamin D₃ Haushalt durch Freisetzung in Zeiten des Vitamin D₃ Bedarfs sofort zur Verfügung steht. Die Freisetzung untersteht dem hormonellen Einfluss von PTH, Prolaktin und möglichen weiteren bisher nicht bekannten Faktoren. Diese Beobachtungen weisen dem Fettgewebe eine wichtige Funktion als ein komplex gesteuertes Reservoir für 1,25(OH)₂D₃ zu, ähnlich den Schilddrüsenfollikeln für T₃ und T₄. Inwieweit auch die Aufnahme von Calcitriol hormonellen Regulationsmechanismen unterliegt und ob durch bestimmte Faktoren eine Blockade der Vitamin D₃ Freisetzung aus den Adipozyten möglich ist, muss im Detail noch erforscht werden. Diese Mechanismen sind aber ebenso wie die Steuerung der Hormonfreisetzung für das Verständnis von Interaktionsmöglichkeiten im Falle einer Vitamin D₃ Intoxikation oder Deprivation von Bedeutung.

Ein weiteres wesentliches Resultat dieser Arbeit ist der Nachweis eines aktiven und regulierten Aufnahmemechanismus für Vitamin D₃ Analoga. Aufgrund dieser Ergebnisse postulieren wir eine receptormediierte Endozytose des Hormons ähnlich oder identisch der des Megalinrezeptors in der Niere und eine intrazelluläre Bindung an Transportproteine. Damit ist die bislang anerkannte Theorie, dass lediglich der ungebundene Anteil der Hormone durch seinen lipophilen Charakter in die Zellen diffundieren und biologisch aktiv werden kann ebenso überholt wie die Unterteilung in hydrophobe Hormone wie beispielsweise die Steroide, die nur an intrazelluläre Rezeptoren binden, und hydrophile Hormone wie Peptidhormone oder Adrenalin, welche an Membranrezeptoren binden und über second messenger intrazelluläre Reaktionen hervorrufen. Vielmehr diskutieren wir das Vorhandensein von zwei verschiedenen Membranrezeptorsystemen, die beide in der Lage sind, den Vitamin D₃/DBP-Komplex zu binden, jedoch unterschiedliche Funktionen haben. Zum einen gibt es die bereits erwähnten megalin-ähnlichen Membranrezeptoren, die für eine spezifische und gesteuerte Aufnahme des Vitamin D₃ in die Zelle verantwortlich sind und damit auch an der Regulierung des intrazellulären Hormonanteils, der an den klassischen

Vitamin D₃ Rezeptor bindet, mitbeteiligt sind. Zum anderen nehmen wir die Existenz eines weiteren Membranrezeptors an, der G-Protein assoziiert ist, und über IP₃ und DAG sekundäre intrazelluläre Reaktionen hervorruft.

Diese Membranrezeptoren für Vitamin-D₃/DBP im Einzelnen zu identifizieren und sequenzieren stellt auch für die Zukunft eine wissenschaftliche Herausforderung dar. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass DBP neben seiner Carrierfunktion vor allem durch seine Fähigkeit der Membranrezeptorbindung und –vermittlung ein weitaus größere Rolle im endokrinen System des Vitamin D₃ spielen wird als bisher angenommen.

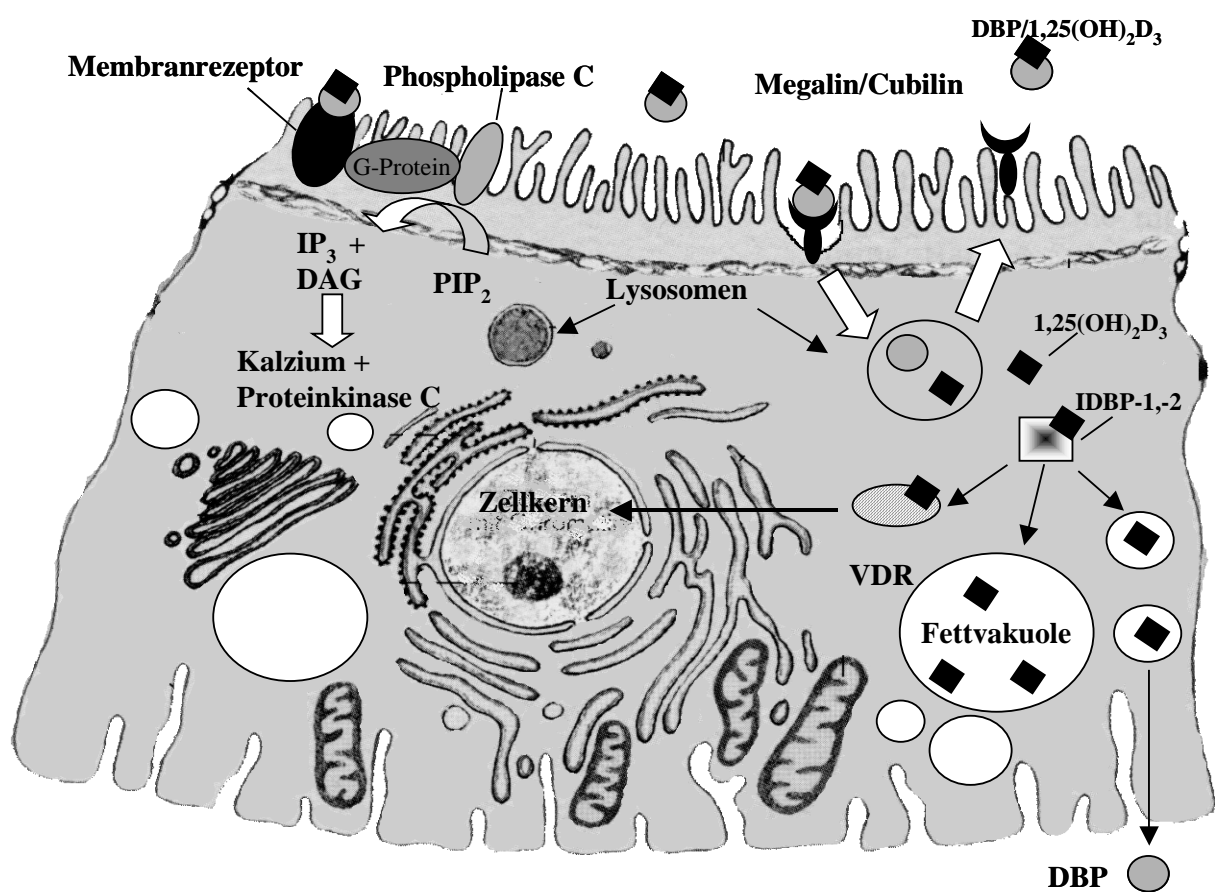


Abb. 27: Zellmodell zur Darstellung der möglichen Membranrezeptoren für den Vitamin D/DBP Komplex und der Aufnahme- und Speichermechanismus für das Hormon.

6. Summary

Vitamin D plays an important role in calcium and phosphat homeostasis and is required for the adequate skeletal development and for maintaining bone integrity. In addition to the calcitropic role, vitamin D also functions in a number of other complex systems, such as the immune system or the central nervous system. Furthermore it promotes cellular differentiation and decreases proliferation.

Vitamin D is a steroid hormone formed from cholesterol in the skin by exposure to ultraviolet light. The hormone undergoes activation by 25-hydroxylation in the liver to form 25-hydroxyvitamin D₃ and hydroxylation in the 1 α -position creating the biologically active metabolite 1,25-dihydroxyvitamin D₃. The second step is performed in the kidney. In plasma all metabolites are bound to vitamin D binding proteins. Regarding the “free hormone hypothesis” only the free nonbound hormone can enter the cells by diffusion and interacts with the intracellular classical VDR to promote transcription of genes. The function of DBP and other carrier proteins has so far been considered transport and regulation of the bioavailability of vitamin D and the protection from excessive free hormone. Recent findings of vitamin D metabolites being reabsorbed in the kidney by a megalin-dependent endocytosis challenged this long-standing model.

To clarify the mechanisms of vitamin D uptake and subcellular targeting, we synthesized red fluorescent vitamin D₃ metabolites and studied the modalities of hormone uptake, storage, and release in adipocytes by fluorescence microscopy, spectrofluorometry and HPLC. All vitamin D₃ analogues were taken up by the adipocytes and selectively accumulated in the lipid droplets of the cells. This process showed a specificity for each analogue and was dependent on temperature, energy and calcium concentration. Additionally, we detected specific saturation kinetics for the uptake of calcitriol and a competitive inhibition. The fluorescent vitamin D₃ analogues were released very slowly from adipocytes over a long period of time. But once released they were immediately available for the vitamin D endocrine system. Even the biologically active compound Calcitriol was stored in the lipid droplets and was able to induce gene transcription after release. The hormones prolactin and PTH had a regulatory influence on the release of calcitriol. In conclusion, the results of this work suggest an important role of the adipose tissue in maintaining the vitamin D homeostasis by uptake, storage, and release of the vitamin D₃ analogues. This process appears not to depend on mere passive diffusion. Instead the active and specific uptake of the hormone indicates a receptor-mediated uptake mechanism in which DBP might have a more critical function than expected.

7. Literaturverzeichnis

- Abe, E.; Miyaura, C.; Sakagami, H.; Takenda, M.; Konno, K.; Yamazaki, T.; Yoshiki, S.; and Suda, T. (1981): Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78: 4990-4994
- Adams, J.S. (1997): Extrarenal production and action of active vitamin D metabolites in Human lymphoproliferative diseases. In: *Vitamin D*, edited by D. Feldman, F.H. Glorieux and J.W. Pike. San Diego, p. 903-921
- Adams, J.S. und Gacad, M.A. (1985): Characterisation of 1α -hydroxylation of vitamin D₃ sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J.Exp.Med.* 161: 755-765
- Allen, S.H. and Shah, J.H. (1992): Calcinosis and metastatic calcification due to vitamin D intoxication. *Horm. Res.* 37: 68-77
- Alroy, I.; Towers, T.L.; and Freedman, L.P. (1994): Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D₃: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5789-5799
- Andersson, S.; Davis, D.L.; Dahlback, H.; Jornvall, H. and Russell, D.W. (1989): Cloning, structure and expression of the mitochondrial cytochrome P450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* 264: 8222-8229
- Anraku, Y.; Kin, E. and Tanaka, Y (1975): Transport of sugars and amino acids in bacteria. XV. Comparative studies on the effects of various energy poisons on the oxidative and phosphorylating activities and energy coupling reactions for the active transport systems for amino acids in *E. coli*. *J Biochem (Tokyo)* 78(1):165-79
- Apriletti, J.W.; Ribeiro, R.C.; Wagner, R.L.; Feng, W.; Webb, P.; Kushner, P.J.; West, B.L.; Nilsson, S.; Scanlan, T.S.; Fletterick, R.J. and Baxter, J.D. (1998): Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 25:S2-11
- Asaka, M.; Iida, H.; Izumino, K.; and Sasayama, S. (1988): Depressed natural killer cell activity in uremia. Evidence for immunosuppressive factor in uremic sera. *Nephron* 49: 291-295
- Asch, L. and Asch, G. (1994): Vitamin D during fasting. *La Presse Medicale* 23(6): 299
- Baker, A.R.; McDonnell, D.P., Hughes, M.; Crisp, T.M.; Mangelsdorf, D.J.; Haussler, M.R.; Pike, J.W.; Shine, J.; and O'Malley, B.W. (1988): Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3294-3298
- Baran, D.; Quail, J.; Ray, R.; Leszyk, G.; and Honeyman, T. (1998): Identification of the membran protein that binds $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and is involved in the rapid actions of the hormon. *Bone* 23, Suppl. S176
- Barsony, J.; Renyi, I.; and McKoy, W. (1996): Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. *J. Biol. Chem.* 272(9): 5774-5782
- Barsony, J. and Smith, C.L. (1995): Development of a Biologically Active Fluorescent-

Labeled Calcitriol and Its Use to Study Hormone Binding to the Vitamin D Receptor. *Analytical Biochemistry*; 229, 68-79

Barton, A.C.; Kang, H.C.; Rinaudo, M.S.; Monsma, F.J.; Stewart-Fram, R.M.; Macinko, J.A.; Haugland, R.P.; Ariano, M.A. and Sibley, D.R. (1991): Multiple fluorescent ligands for dopamine receptors. I. Pharmacological characterization and receptor selectivity. *Brain Res.* 547, 199-207

Baudino, T.A.; Kraichely, D.M.; Jefcoat, S.C.; Partridge, N.C.; and MacDonald, P.N. (1998): Isolation of a novel coactivator, NcoA-62, involved in vitamin D mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 273: 16434-16441

Bernlohr, D.A.; Bolanowski, M.A.; Kelly, T.J.; and Lane, M.D. (1985): Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 5563-5567

Bikle, D.D.; Nemanic, M.K.; Gee, E.A., and Elias, P. (1986): 1,25-Dihydroxyvitamin D production by human keratinocytes: kinetics and regulation. *J. Clin. Invest.* 78: 557-566

Bikle, D.D.; and Gee, E. (1989): Free, and not total, 1,25-dihydroxyvitamin D regulates 25-hydroxy D metabolism by keratinocytes. *Endocrinology* 124: 649-654

Blanco, J.C.; Wang, I.M.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J.; BW, O.M.; Jurutka, P.W.; Haussler, M.R.; and Ozato, K. (1995): Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1535-1539

Bouillon, R.; Van Assche, F.A.; Van Baelen, H.; Heyns, W.; and De Moor, P. (1981): Influence of vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentration. *J. Clin. Invest.* 67: 589-596

Bourdaeu, A.; Atmani, F.; Grosse, B.; and Lieberherr, M. (1990): Rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and extracellular Ca²⁺ on phospholipid metabolism in dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 127: 2738-2743

Boyan, B.D.; Posner, G.H.; Greising, D.M.; White, M.C.; Sylvia, V.L.; Dean, D.D.; and Schwartz, Z. (1997): Hybrid structural analogues of regulate chondrocyte proliferation and proteoglycan production as well as protein kinase C through a nongenomic pathway. *J. Cell. Biochem.* 66: 457-470

Brouwer, D.A.J.; van Beek, J.; Ferwerda, H.; Brugman, A.M.; van der Klis, F.R.M.; van der Heiden, H.J.; and Muskiet, F.A.J. (1998): Rat adipose tissue rapidly accumulates and slowly releases an orally-administered high vitamin D dose. *Brit. J. of Nutr.* 79: 527-532

Brown, E.M.; Gamba, G.; Riccardi, D.; Lombardi, M.; Butters, R.; Kifor, O.; Sun, A.; Hediger, M.A.; Lutton, J.; and Herbert, S.C. (1993): Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575-580

Burmester, J.; Wiese, R.; Maeda, N.; and DeLuca, H.F. (1988): Structure and regulation of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 9499-9502

- Canteley, L.K.; Russell, J.; Lettieri, D.; and Sherwood, L.M. (1985): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses parathyroid hormone secretion from bovine parathyroid cells in tissue culture. *Endocrinology* 117: 2114-2119
- Carlberg, C.; Saurat, J.H. (1996): Vitamin D-retinoid association: molecular basis and clinical applications. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1(1):82-6
- Carlson, A. (1952): Tracer experiments on the effects of vitamin D on the skeletal metabolism of calcium and phosphorus. *Acta. Physiol. Scand.* 26: 212-220
- Chaplis, H.; Clark, L.D.; and Ropes, M.W. (1951): Vitamin D intoxication. *Am. J. Med. Sci.* 221: 369-378
- Chen, T.C.; Castillo, L.; Korycka-Dahl, M.; and DeLuca, H.F. (1974): Role of vitamin D metabolites in phosphate transport of rat intestine. *J. Nutr.* 104: 1056-1060
- Chideckel, E.W.; Goodner, C.J.; Koerker, D.J.; Johnson, D.G. and Ensink, J.W. (1977): Role of glucagon in mediating metabolic effects of epinephrine. *Am J Physiol* 232(5):E464-70
- Christakos, S.; Grill, R.; Lee, S.; and Li, H. (1992): Molecular aspects of the calbindins. *J. Nutr.* 122: 678-682
- Christensen, E.I. and Willnow, T.E. (1999): Essential role of megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2224-2236
- Clarke, S.L.; Robinson, C.E.; and Gimble, J.M. (1997): CCAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promotor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 99-103
- Clements, M.R. and Fraser, D.R. (1988): Vitamin D supply to the rat fetus and neonate. *J. Clin. Invest.* 81(6): 1768-1773
- Clevenger, C.V. and Plank, T.L. (1997): Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (1):59-68
- Cooke, N.E.; and Haddad, J.G. (1989): Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endoc. Rev.* 10: 294-307
- Cooke, N.E.; McLeod, J.F.; Wang, X.K.; and Ray, K. (1991): Vitamin D binding protein: genomic structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 40(4-6):787-93
- Cornelius, P.; MacDougald, O.A.; and Lane, M.D. (1994): Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 99-129
- Cross, H.S.; Hulla, W.; Tong, W.-M.; and Peterlik, M. (1995): Growth regulation of human colon adenocarcinoma-derived cells by calcium, vitamin D and epidermal growth factor. *J. Nutr.* 125: 2004S- 2008S
- Danielian, P.S.; White, R.; Lees, J.A.; and Parker, M.G. (1992): Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11: 1025-1033

de Jong, M.; Visser, T.J.; Bernard, B.F.; Docter, R.; Vos, R.A.; Hennemann, G. and Krenning, E.P. (1993): Transport and metabolism of iodothyronines in cultured human hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 77:139–143

DeLuca, H.F. (1974): Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Fed Proc*; 33: 2211-2219

DeLuca, H.F. (1984): The metabolism, physiology, and function of vitamin D. In: *Vitamin D, Basic and Clinical Aspects*. Kumar, R., ed. Boston: Nijhoff Publishing: 259-302

DeLuca, H.F.; and Schnoes, H.K. (1976): Metabolism in mechanism of action of vitamin D₃. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 631-666

Demay, M.B.; Gerardi, J.M.; DeLuca, H.F.; and Kronenberg, H.M. (1990): DNA sequences in the rat osteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 369-373

Demay, M.B.; Kiernan, M.S.; DeLuca, H.F.; and Kronenberg, H.M. (1992): Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind to the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 8097-8101

Elaroussi, M.A.; Prahl, J.M.; and DeLuca, H.F. (1994): The avian vitamin D receptors: primary structures and their origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11596-11600

Evans, R.M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895

Frase, D.R. and Kodicek, D. (1973): Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyroid hormone. *Nature New. Biol.* 241: 163-166

Fraser, D.R. und Kodicek, E. (1970): Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* 228: 764-766

French, A.N.; Wilson, S.R.; Welch, M.J. and Katzenellenbogen, J.A. (1993): A synthesis of 7 alpha-substituted estradiols: synthesis and biological evaluation of a 7 alpha-pentyl-substituted BODIPY fluorescent conjugate and a fluorine-18-labeled 7 alpha-pentylestradiol analog. *Steroids* 58, 157-169

Frolov, A.; Petrescu, A.; Atshaves, B.P.; So, P.T.; Gratton, E.; Serrero, G. and Schroeder, F. (2000): High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach. *J Biol Chem* 275(17):12769-80

Gacad, M.A. and Adams, J.S. (1998): Proteins in the heat shock-70 family specifically bind 25-hydroxyvitamin D₃ and 17β-estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 1264-1267

Garabedian, M.; Holick, M.F.; DeLuca, H.F.; and Boyle, I.T. (1972): Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by the parathyroid glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1673-1676

Geoffriau, M.; Brun, J.; Chazot, G. and Claustrat, B. (1998): The physiology and pharmacology of melatonin in humans. *Horm Res* 49(3-4):136-41

- Ghazarian, J.G.; Jefcoate, C.R.; Knutson, J.C.; Orme-Johnson, W.H. und DeLuca, H.F (1974): Mitochondrial cytochrome p450. A component of chick kidney 25-hydrocholecalciferol-1 α -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 249: 3026-3033
- Glass, C.K.; Rose, D.W.; and Rosenfeld, M.G. (1997): Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 222-232
- Glenville, J.; Strugnell, S.A.; and DeLuca, H.F. (1998): Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews* 78: 1193-1231
- Green, H. and Kehinde, O. (1974): An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1 : 113-116
- Green, H. and Kehinde, O. (1979): Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J. Cell Physiol.* 101: 169-172
- Gregoire, F.M.; Smas, C.M.; and Sul, H.S. (1998): Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78: 783-809
- Haddad, J.G. (1995): Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53: 1-6
- Hanewald, K.H.; Rappoldt, M.P. und Roborgh, J.R. (1961): The antirachitic activity of previtamin D₃. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. Belg.* 80: 1063-1069
- Harmon, J.S. and Sheridan, M.A. (1992): Effects of nutritional state, insulin, and glucagon on lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 87(2):214-21
- Hauner, H. (1990): Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions. *Endocrinology* 127(2):865-72
- Haussler, M.R.; Whitfield, G.K.; Haussler, C.A.; Hsieh, J.C.; Thompson, P.D.; Selznick, S.H.; Dominguez, C.E.; and Jurutka, P.W. (1998): The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.* 13: 325-349
- Hennemann, G.; Doctor, R.; Friesema, E.C.H.; de Jong, M.; Krenning, E.P. and Visser, T.J. (2001): Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocrine Reviews* 22(4):451-476
- Henry, H.L. (1981): Insulin permits parathyroid hormone stimulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production in cultured kidney cells. *Endocrinology* 108: 733-735
- Hidiroglou, M. and Williams, C.J. (1984): Vitamin D₃ levels in certain sheep tissues at various times after the intramuscular administration of vitamin D₃. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 54(1): 17-23
- Hillier, A.P. (1968): The uptake of thyroxine and tri-iodothyronine byperfused hearts. *J Physiol* 199:151-160
- Holick, M.F.; Chen, M.L.; Kong, X.F.; and Sanan, D.K. (1996): Clinical uses for calciotropic hormones 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone related peptide in dermatology: a new perspective. *J. Invest. Dermatol. (Symp. Proc)* 1: 1-9

- Holick, M.F.; Frommer, J.E.; McNeill, S.C.; Richtand, N.M.; Henley, J.W. und Potts, J.T. (1977): Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 107-114
- Hollis, B.W.; Roos, B.A.; Draper, H.H. and Lambert, P.W. (1981): Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk. *J. Nutr.* 111(7): 1240-1248
- Holm, A.C. and Jacquemin, C. (1979): Membrane transport of l-triiodothyronine by human red cell ghosts. *Biochem Biophys Res Commun* 89:1006 –1017
- Huang, Y.; Ishizuka, T.; Miura, A.; Kajita, K.; Ishizawa, M.; Kimura, M.; Yamamoto, Y.; Kawai, Y.; Morita, H.; Uno, Y.; and Yasuda, K. (2001): Effect of 1 alpha,25-dihydroxy vitamin D₃ and vitamin E on insulin-induced glucose uptake in rat adipocytes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 55(3):175-83
- Ishizuka, S.; and Norman, A.W. (1987): Metabolic pathways from 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ to 1α,25dihydroxyvitamin D₃ -26,23-lactone. Stereo-retained and stereo-selective lactonization. *J. Biol. Chem.* 262: 7165-7170
- Jensen, M.D.; Haymond, M.W.; Gerich, J.E.; Cryer, P.E. and Miles, J.M. (1987): Lipolysis during fasting. Decreased suppression by insulin and increased stimulation by epinephrine. *J Clin Invest* 79(1):207-13
- Jones, G.; Strugnell, S.A. and DeLuca, H.F. (1998): Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.* 78: 1193-1231
- Jono, S.; Nishizawa, Y.; Shioi, A.; and Morii, H. (1998): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98: 1302-1306
- Kahn, S.M.; Hryb, D.J.; Nakhla, A.M.; Romas, N.A. and Rosner, W. (2002): Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol.* 175(1):113-20
- Kamei, Y; Kawada, T.; Fukuwatari, T.; Ono, T.; Kato, S.; and Sugimoto, E. (1995): Cloning and sequencing of the gene encoding the mouse vitamin D receptor. *Gene* 152: 281-282
- Kamimura, S.; Gallieni, M.; Zhong, M.; Beron, W.; Slatopolsky, E.; and Dusso, A. (1995): Microtubules mediate cellular 25-hydroxyvitamin D₃ trafficking and the genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in normal human monocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 22160-22166
- Kavetskii, R.E.; Shuklinov, V.A. (1978): Differentiation of a transformed culture of L cells. *Biull Eksp Biol Med* 86(8):242-5
- Kimmel-Jehan, C. and DeLuca, H.F. (1997): Salt concentration determines 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dependency of vitamin D receptor–retinoid X receptor-vitamin D-response element complex formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 341(1), 75-80
- Kliwer, S.A.; Umesono, K.; Mangelsdorf, D.J.; and Evans, R.M. (1992): Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signalling. *Nature* 355: 446-449

- Knutson, J.C., and DeLuca, H.F. (1974): 25-Hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. Subcellular distribution and properties. *Biochemistry* 13: 1543-1548
- Kouzarides, T.; and Bannister, A.J. (1997): The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384: 641-643
- Krenning, E.P.; Docter, R.; Bernard, H.F.; Visser, T.J. and Hennemann, G. (1979): The essential role of albumin in the active transport of thyroid hormones into primary cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett* 107:227-230
- Kute, T.E.; Linville, C.; and Barrows, G. (1983): Cytofluorometric analysis for estrogen receptors using fluorescent estrogen probes. *Cytometry* 4(2):132-40
- Labuda, M.K.; Morgan, K. und Glorieux, F.H. (1990): Mapping autosomal recessive vitamin D dependency type I to chromosome 12q14 by linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 28-36
- Lackner, C.; Daufeldt, S.; Wildt, L. and Allera, A. (1998): Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles. III. Specificity and stereospecificity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 164 (1-2):69-82
- Lane, M.D.; Tang, Q.; and Jiang, M. (1999): Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 677-683
- Lawson, D.E.M.; Sedrani, S.H.; and Douglas, J. (1986): Interrelationships in rats of tissue pools of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol formed in u.v. light. *Biochem. J.* 233: 535-540
- Lechowski, R.; Bielecki, W.; Sawosz, E.; Krawiec, M.; and Klucinski, W. (1999): The effect of lecithin supplementation on the biochemical profile and morphological changes in the liver of rats fed different animal fats. *Vet Res Commun* 23(1):1-14
- Li, Y.C.; Meuse, J.; Guo, J.; Bringhurst, F.R.; and Demay, M. (1998): Analysis of rapid cellular response to vitamin D treatment in mouse osteoblasts lacking the vitamin D receptor. *Bone* 23, Suppl.: S263
- Lieberherr, M. (1987): Effects of vitamin D₃ metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 262: 13168-13173
- Lin, F.T. and Lane, M.D. (1994): CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8757-8761
- Makin, G.; Lohnes, D.; Byford, V.; Ray, R.; and Jones, G. (1989): Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation. *Biochem. J.* 262: 173-180
- Martin, D.L. and DeLuca, H.F. (1969): Calcium transport and the role of vitamin D. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 139-148

- Masuda, S.; Strugnell, S.; Calverly, M.J.; Makin, H.L.J.; Kremer, R.; and Jones, G. (1994): In vitro metabolism of the anti-psoriatic vitamin D analog, calcipotriol, in two cultured human keratinocyte models. *J. Biol. Chem* 269:4794-4803
- Matsuoka, L.Y.; Ide, L.; Wortsman, J.; MacLaughlin, J. und Holick, M.F. (1987): Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 1165-1168
- Mawer, E.B.; Backhouse, J.; Holman, C.A.; Lumb, G.A.; and Stanbury, S.W. (1972): The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clinical Science* 40: 39-53
- McNeilly, A.S.; Robinson, I.C.; Houston, M.J. and Howie, P.W. (1983): Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286(6361):257-259
- Mellanby, E. (1919): An experimental investigation on rickets. *Lancet* 1; 407-412
- Mendel, C.M. (1989): The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr. Rev.* 10: 232-274
- Miksicek, R.J. (1993): In situ localization of the estrogen receptor in living cells with the fluorescent phytoestrogen coumestrol. *J Histochem Cytochem.* 1993 41(6):801-10
- Moestrup, S.K. and Verroust, P.J. (2001): Magalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 407-428
- Morelli, S.; de Boland, A.R.; and Boland, R.L. (1993): Generation of inositol phosphates, diacylglycerol and calcium fluxes in myoblasts treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem. J.* 289: 675-679
- Napoli, J.L. (1996): Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80 (3Pt 2): S52-S62
- Negrel, R.; Grimaldi, P.; and Ailhaud, G. (1978): Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 6054-6058
- Nemere, I.; Dormanen, M.C.; Hammond, M.W.; Okamora, W.H.; and Norman, A.W. (1994): Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcalcia. *J. Biol. Chem.* 269: 23750-23756
- Nemere, I.; Schwartz, Z.; Petrozo, H.; Sylvia, V.L.; Dean, D.D.; and Boyan, B.D. (1998): Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates the rapid activation of protein kinase C. *J. Bone. Miner. Res.* 13: 1353-1359
- Nemere, I.; Yoshimoto, Y.; and Norman, A.W. (1984): Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 115: 1476-1483
- Noda, M.; Vogel, R.L.; Craig, A.M.; Prah, J.; DeLuca, H.F.; and Denhardt, D.T. (1990): Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃

receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (Spp-1 or osteopontin) gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9995-9999

Novikoff, A.B.; Novikoff, P.M.; Rosen, O.M.; and Rubin, C.S. (1980): Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Biol.* 87: 180-196

Nykjaer, A.; Dragun, D.; Walther, D.; Vorum, H.; Jacobsen, C.; Herz, J.; Melsen, F.; Christensen, E.I.; and Willnow, T.E. (1999): An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell* 96: 507-515

Nykjaer, A.; Fyfe, J.C.; Kozyraki, R.; Leheste, J.-R.; Jacobsen, C.; Nielsen, M.S.; Verroust, P.J.; Aminoff, M.; de la Chapelle, A.; Moestrup, S.K.; Ray, R.; Gliemann, J.; Willnow, T.E.; and Christensen, E.I. (2001): Cubulin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13895-13900

Okano, T.; Yasumura, M.; Mizuno, K.; Kobayashi, T. (1977): Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D₃ in rat skin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 23: 165-168

Okuda, K.I.; Usui, E. und Ohyama, Y. (1995): Recent progress in enzymology and molecular biology of enzymes involved in vitamin D metabolism. *J. Lipid. Res.* 36: 1641-1652

Onate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J.; and BW., O.M. (1995): Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357

Ouahchi, K.; Arita, M.; Kayden, H.; Hentati, F.; Ben Hamida, M.; Sokol, R.; Arai, H.; Inoue, K.; Mandel, J.L. and Koenig, M. (1995): Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 9(2):141-5

Oxenhandler, R.W.; McCune, R.; Subtelney, A.; Truelove, T.; and Tyrer, H.W. (1984): Flow cytometric determination of estrogen receptors in intact cells. *Cancer Res.* 44(6):2516-23

Ozono, K.; Sone, T.; and Pike, J.W. (1991): The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Bone Miner. Res.* 6: 1021-1027

Perez, A.; Chen, T.C.; Turner, A.; Raab, R.; Bhawan, J.; Poche, P.; and Holick, M.F. (1996): Efficacy and safety of topical calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) for the treatment of psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 134: 238-246

Pons, M.; Robinson, T.E.J.; Mercier, L.; Thompson, E.B.; and Simons, S.S. (1985): Formation of a fluorescent glucocorticoid receptor-steroid complex in HTC cell cytosol. *J Steroid Biochem.* 23(3):267-73.

Postlind, H.; Axen, E.; Bergman, T. und Wikvall, K. (1997): Cloning, structure and expression of a cDNA encoding vitamin D₃ 25-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 491-497

Querfeld, U.; Hoffmann, M.M.; Klaus, G.; Eifinger, F.; Ackerschott, M.; Michalk, D. and Kern, P.A. (1999): Antagonistic effects of vitamin D and parathyroid hormone on lipoprotein lipase in cultured adipocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10(10):2158-2164

Rao, G.S.; Eckel, J.; Rao, M.L. and Breuer, H. (1976): Uptake of thyroid hormone by isolated rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 73:98-104

- Rao, M.L.; Rao, G.S.; Holler, M.; Breuer, H.; Schattenberg, P.J. and Stein, W.D. (1976): Uptake of cortisol by isolated rat liver cells. A phenomenon indicative of carrier-mediation and simple diffusion. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357(4):573-84
- Rasmussen, H.; DeLuca, H.F.; Arnaud, C.; Hawker, C.; and Stedingk, M.V. (1963): The relationship between vitamin D and parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 42: 1940-1946
- Reddy, G.S.; and Tserng, K.Y. (1989): Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry* 28: 1763-1769
- Reichel, H.; Koeffler, H.P. und Norman, A.W. (1989): The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 320: 981-991
- Reiter, R.J. (1998): Melatonin and human reproduction. *Ann Med* ;30(1):103-108
- Reznikoff, C.A.; Brankow, D.W.; and Heidelberger, C. (1973): Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to post-confluence inhibition of division. *Cancer Res.* 33: 3231-3238
- Riley, W.W. and Eales, J.G. (1993): Characterization of l-thyroxine transport into hepatocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 90:31-42
- Rosenstreich, S.J.; Rich, C.; and Volwiler, W. (1971): Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J. of Clin. Invest.* 50: 679-687
- Rosner, W.; Hryb, D.J.; Khan, M.S.; Nakhla, A.M. and Romas, N.A. (1999): Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69(1-6):481-5
- Ross, T.K.; Prahl, J.M.; and DeLuca, H.F. (1991): Overproduction of rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in insect cells using the baculovirus expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6555-6559
- Rungby, J.; Mosekilde, L.; and Poulsen, J.H. (1990): Evidence for long-term storage of calcitriol in a patient with 1-alpha hydroxylase deficiency and rickets. *Acta Endocrinologica* 123: 383-384
- Rungby, J.; Mortensen, L.; Jakobsen, K.; Brock, A.; and Mosekilde, L. (1993): Distribution of hydroxylated vitamin D metabolites [25OHD₃ and 1,25(OH)₂D₃] in domestic pigs: evidence that 1,25(OH)₂D₃ is stored outside the blood circulation? *Comp. Biochem. Physiol.* 3: 483-484
- Saez, S.; Falette, N.; Guillot, C.; Meggouh, F.; Lefebvre, M.-F.; and Crepin, M. (1993): 1,25(OH)₂D₃ modulation of mammary tumor cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* 27: 69-81
- Saito, A.; Pietromonaco, S.; Loo, A.K.-C.;(1994): Complete cloning and sequencing of rat gp330/megalin. A distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9725-9729
- Seliger, H.H. and McElroy, W.D. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 136

- Shetty, K.R.; Ajiouni, K.; Rosenfeld, P.S.; and Hagen, T.C. (1975): Protracted vitamin D toxicity. *Arch. Intern. Med.* 135: 986-988
- Shi, H.; Norman, A.W.; Okamura, W.H.; Sen, A.; and Zemel, M.B. (2001): 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *FASEB J.* 15(14):2751-2753
- Shi, H.; Norman, A.W.; Okamura, W.H.; Sen, A.; and Zemel, M.B. (2002): 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits uncoupling protein 2 expression in human adipocytes. *FASEB J* 2002 16(13):1808-1810
- Shimizu, M.; Kamachi, S.; Nishii, Y.; and Yamada, S. (1991): Synthesis of a reagent for fluorescence-labeling of vitamin D and its use in assaying vitamin D metabolites. *Anal Biochem.* 194(1):77-81.
- Shinki, T.; Shimada, H.; Wakino, S.; Anazawa, H.; Hayashi, M.; Saruta, T.; DeLuca, H.F.; and Suda, T. (1998): Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 12920-12925
- Smith, C.L.; Onate, S.A.; Tsai, M.J.; and BW, O.M. (1996): CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93: 8884-8888
- St.-Atnaud, R.; Arabian, A.; and Glorieux, F.H. (1996): Abnormal bone development in mice deficient for the vitamin D-24-hydroxylase gene. *J. Bone Min. Res.* 11, Suppl.: S126
- Steiner, K.E.; Fuchs, H.; Williams, P.E.; Stevenson, R.W.; Cherrington, A.D. and Alberti, K.G. (1985): Regulation of ketogenesis by epinephrine and norepinephrine in the overnight-fasted, conscious dog. *Diabetes* 34(5):425-32
- Stern, P.H. and Bell, N.H. (1989): Disorders of vitamin D metabolism: toxicity and hypersensitivity. In: Tam CS, Heersche JNM, Murray TM, eds. *Metabolic bone disease: cellular and tissue mechanisms*. Boca Raton, FL: CRC Press 203-213
- Stroder, J.; and Kasal, P. (1970): Phagocytosis in vitamin D deficient rickets. *Klin. Wochenschr.* 48: 383-384
- Student, A.K.; Hsu, R.Y.; and Lane, M.D. (1980): Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 255: 4745-4750
- Sugimoto, T.; Ritter, C.; Ried, I.; Morrissey, J; and Slatopolsky, E. (1988): Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cytosolic calcium in dispersed parathyroid cells. *Kidney Int.* 33: 850-854
- Sylvia, V.L.; Schwartz, Z.; Ellis, E.B.; Helm, S.H.; Gomez, R.; Dean, D.D.; and Boyan, B.D. (1996): Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 α ,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃. *J. Cell. Physiol.* 167: 380-393
- Sysuev, V.A.; Kholodenko, V.P. and Okorokov, L.A. (1977): Transport of amino acids and calcium in the fungus, *Phytophthora infestans*. *Biokhimiia* 1977 42(6):1014-9
- Szymczak, E. and Laskowska-Klita, T. (2001): The role of leptin in human obesity. *Med Wieku Rozwoj* 5(1):17-26

- Tanaka, Y. and DeLuca, H.F. (1973): The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 566-574
- Tanaka, Y.; and DeLuca, H.F. (1974): Stimulation of 24,24-dihydroxyvitamin D₃ production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Science* 183: 1198-1200
- Tanaka, Y.; Lorenc, R.S.; and DeLuca, H.F. (1975): The role of 1,25-dihydroxyvitamin and parathyroid hormone in the regulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 171: 521-526
- Tata, J.R. (1964): Distribution and metabolism of thyroid hormones. *Pitt-Rivers R, Trotter WR, eds. The thyroid gland. London: Butter Worths; 163-186*
- Tate, B.F.; Allenby, G.; Perez, J.R.; Levin, A.A.; and Grippo, J.F. (1996): A systemic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity. *FASEB J.* 10: 1524-1531
- Toda, T.; Ito, M.; Toda, Y.; Smith, T. and Kummerow, F. (1984): Angiotoxicity in swine of a moderate excess of dietary vitamin D₃. *Chem. Toxic.* 6: 585-592
- Tomon, M.; Tenenhouse, H.S.; and Jones, G. (1990): Expression of 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase activity in Caco-2 cells. An in vitro model of intestinal vitamin D catabolism. *Endocrinology* 126: 2868-2875
- Towers, T.L.; Luisi, B.F.; Asianov, A.; and Freedman, L.P. (1993): DNA target selectivity by the vitamin D₃ receptor: mechanism of dimer binding to an asymmetric repeat element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6310-6314
- Tsutsui, T. and Stabenfeldt, G.H. (1993): Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl* 47:29-35
- Van der Klis, F.R.M.; Jonxis, J.H.P.; van Doormaal, J.J.; Sikkens, P.; Saleh, A.E.C.; and Muskiet, F.A.J. (1996): Changes in vitamin D metabolites and parathyroid hormone in plasma following cholecalciferol administration to pre- and postmenopausal women in the Netherlands in early spring and to postmenopausal women in Curacao. *Brit. J. of Nutr.* 75: 637-646
- Wood, K.V. (1991) In: *Bioluminescence & Chemiluminescence: Current Status*, eds. P. Stanley and L. Kricka, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 543.
- Wu, S.; Finch, J.; Zhong, M.; Slatopolsky, E.; Grieff, M.; and Brown, A.J. (1996): Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am. J. Physiol.* 271 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 40): F203-F208
- Wu, S.; Ren, S.; Chen, H.; Chun, R.F.; Gacad, M.A.; and Adams, J.S. (2000): Intracellular vitamin D binding proteins: novel facilitators of vitamin D-directed transactivation. *Mol. Endocrinology* 14(9): 1387-1397
- Yamamoto, M.; Kawanobe, Y.; Takahashi, H.; Shimazawa, E.; Kimura, S.; and Ogata, E. (1984): Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J. Clin. Invest.* 74: 507-513

Zierold, C.; Darwish, H.M.; and DeLuca, H.F. (1994): Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gen.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 900-902

Zierold, C.; Darwish, H.M.; and DeLuca, H.F. (1995): Two vitamin D response elements function in the rat 1,25-dihydroxyvitamin d 24-hydroxylase promoter.

J. Biol. Chem. 270: 1675-1678

Zonefrati, R.; Rotella, C.M., Toccafondi, R.S. and Arcangeli, P. (1983): Thyroid hormone receptors in human cultured fibroblasts: evidence for cellular T4 transport and nuclear binding. *Horm Metab Res* 15: 151-154

Danksagung

Herzlicher Dank ergeht an:

Prof. Dr. G.F. Jirikowski, der mich vor allem während des theoretischen Teils der Arbeit über all die Jahre hinweg auf das Beste betreute und mir jederzeit für die Diskussion von Fragen und Problemen zur Seite stand.

Dr. Kirsten Prüfer, die meine Faszination am wissenschaftlichen Arbeiten weckte und mir auf viele Arten und Weise Impulse zu vergeben mochte, die weit über die Wissenschaft hinausgingen.

Dr. Julia Barsony, die mich vor allem während des praktischen Teils meiner Promotion durch ihre Erfahrung und guten Rat unterstützte und mir viele wichtige Kenntnisse und Fertigkeiten vermittelte.

Colin Segovis, für die ständige Bereitstellung von fluoreszierenden Vitamin D₃ Analoga sowie zahlreiche Diskussionen und Anregungen.

All die anderen, hier nicht namentlich erwähnten wichtigen Menschen, die mir in den letzten Jahren und bei der Entstehung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Claudia Schröder
Geburtstag/Geburtsort:	07.03.1977, Ilmenau
Adresse:	Brockhausstraße 68 04229 Leipzig
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Schulbildung:

09/1983 – 06/1991	POS „Ernst-Thälmann“, Mühlhausen
09/1991 – 06/1995	Gymnasium „Albert-Schweitzer“, Mühlhausen

Hochschulstudium:

10/1995 – 12/2002	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/1997	Physikum
09/1998	Erstes Staatsexamen
09/2001	Zweites Staatsexamen
10/2001 – 09/2002	Praktisches Jahr
1. Tertial:	Innere Medizin am KKH “St. Nepomuk” in Erfurt
2. Tertial:	Pädiatrie am Queen Elizabeth Hospital in Barbados
3. Tertial:	Chirurgie am Portiuncula Hospital in Irland
12/2002	Drittes Staatsexamen

Labortätigkeit:

04/1999 – 04/2000 & 09/2001 – 10/2001:	Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Julia Barsony, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
---	---

Promotion:

seit 1999: am Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena, AG Prof. Dr. Jirikowski

Beruf:

seit 02/2003 Ärztin im Praktikum am Städt. Klinikum
“St. Georg” Leipzig, 2. Innere Klinik

Leipzig, den 16.01.2004

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Jirikowski, Dr. Kirsten Prüfer, Dr. Julia Barsony,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Leipzig, den 16.01.2004

Claudia Schröder